

Struktur und Funktion von Fermentierern und Methanogenen in einem sauren Niedermoor

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Alexandra Hamberger

Bayreuth, Juni 2008

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2005 bis Mai 2008 am Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Harold L. Drake angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zu Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Promotionsgesuch eingereicht am:

18. Juni 2008

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums:

28. Januar 2009

Prüfungsausschuss:

Prof. Harold L. Drake

(Erster Gutachter)

Prof. Dr. Ortwin Meyer

(Zweiter Gutachter)

Prof. Dr. Egbert Matzner

(Vorsitzender)

Prof. Dr. Wolfgang Schumann

Prof. Dr. Franz Meußdörfer

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Treibhausgas Methan	1
1.2. Der Kohlenstofffluss zu Methan in Mooren	2
1.2.1. Ökologie von Feuchtgebieten	2
1.2.2. Polymere und Monomere in Mooren	4
1.2.3. Biogeochemische Prozesse in Mooren	6
1.3. Am anaeroben Kohlenstofffluss beteiligte mikrobielle Prozesse	9
1.3.1. Fermentation	9
1.3.2. Acetogenese	11
1.3.3. Methanogenese	13
1.4. Hypothese und Zielsetzung	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. Untersuchungsstandort Schlöppnerbrunnen	17
2.2. Probenahme	19
2.3. Analytische Methoden	21
2.3.1. Gasphase	21
2.3.2. Flüssigphase	24
2.3.2.1. Probenvorbereitung	24
2.3.2.2. Organischen Säuren, Alkohole und Zucker	24
2.3.2.3. Nitrat	25
2.3.2.4. Fe(II)	25
2.3.2.5. Sulfat	25
2.4. Lösungen und Medien	26
2.4.1. Lösungen	26
2.4.1.1. Mineralsalzlösung	26
2.4.1.2. Spurenelementlösung	27
2.4.1.3. Vitaminlösung	27
2.4.1.4. Inkubationslösung	28

2.4.1.5.	Cäsiumtrifluoracetat (CsTFA)- Gradientenlösung	28
2.4.2.	Medien	28
2.4.2.1.	MH4	29
2.4.2.2.	VL55	29
2.4.2.3.	Substratzugabe	29
2.4.2.4.	SOC- Medium	30
2.4.2.5.	LB- Platten mit Ampicillin/IPTG/X-Gal	30
2.5.	Wachstumsmessungen	31
2.6.	Stammkulturen	32
2.7.	Kultivierung fakultativer Aerobier und obligater Anaerobier	33
2.7.1.	Verdünnungsreihen	33
2.7.2.	Medientransfer	33
2.7.3.	Isolierung	34
2.8.	Inkubation mit stabilen Isotopen	35
2.8.1.	Vorinkubationen	35
2.8.2.	Bodeninkubationen mit ^{12}C - und ^{13}C - Substraten	35
2.9.	Molekularbiologische Methoden	36
2.9.1.	Extraktion von RNA und DNA	36
2.9.2.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.9.3.	Dichtegradienten- Zentrifugation	37
2.9.4.	Fraktionierung von ^{12}C - und ^{13}C - RNA	38
2.9.5.	Präzipitierung der RNA aus den Fraktionen	38
2.9.6.	Vervielfältigung und Analyse von Nukleinsäuren	39
2.9.6.1.	Reverse Transkription der RNA	39
2.9.6.2.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	39
2.9.7.	Aufreinigung von PCR Produkten	42
2.9.8.	Gelelektrophorese Systeme	42
2.9.8.1.	Agarose Gelelektrophorese	42
2.9.8.2.	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)	43
2.9.8.3.	Terminale- Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP)- Analyse	45
2.9.8.4.	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)- Analyse	47
2.9.9.	Klonierung	47
2.9.9.1.	Ligation	48
2.9.9.2.	Transformation	48

2.9.9.3.	Klon-Screening und Insertkontrolle	49
2.9.10.	Sequenzanalyse und Stammbaumberechnung	49
2.9.11.	RNA Microarray	50
2.9.11.1.	<i>In vitro</i> Transkription und Fluoreszenzmarkierung von Amplikons	50
2.9.11.2.	Fragmentierung von markierter RNA	51
2.9.11.3.	Sondenentwicklung	51
2.9.11.4.	Spotting und Immobilisierung der Objektträger	53
2.9.11.5.	Hybridisierung	54
2.9.11.6.	Visualisierung und Analyse	55
2.10.	Verwendete Chemikalien und Gase	56
2.11.	Statistische Verfahren	56
2.11.1.	Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler	56
2.11.2.	Rarefaction Analyse	56
2.11.3.	SPSS, Cluster Analyse	57
3.	ERGEBNISSE	58
3.1.	Kultivierung fakultativer Aerobier und obligater Anaerobier	58
3.1.1.	Anreicherung fakultativer Aerobier und obligater Anaerobier	58
3.1.2.	Isolierung fakultativer Aerobier und obligater Anaerobier	63
3.2.	Effekt von Ethanol, Xylose und Glucose auf den Kohlenstofffluss im Niedermoor	69
3.2.1.	Vorinkubationen	69
3.2.2.	Effekt von Ethanol auf den Kohlenstofffluss	69
3.2.3.	Effekt von Xylose und Glucose auf den Kohlenstofffluss	73
3.3.	Identifikation von ¹³C-markierter Mikrobiota	75
3.3.1.	Analyse der ¹² C- und ¹³ C-angereicherten Fraktionen	75
3.3.2.	Phylogenetische Analyse aktiver prokaryotischer Populationen	78
3.4.	Distribution und Identifikation der mikrobiellen Gemeinschaft im Niedermoor	88
3.4.1.	Abschätzung der mikrobiellen Heterogenität	88
3.4.2.	Phylogenetische Analyse detektierter 16S rRNA Gene	91
3.4.3.	Tiefenprofile und Identifizierung von <i>Bacteria</i> - und <i>Archaea</i> - 16S rRNA Genen	93
3.4.4.	Zusammenfassende Analyse	97

3.5. Entwicklung des <i>Archaea</i>-Phylochips	103
3.5.1. Auswahl und <i>in silico</i> Entwicklung <i>Archaea</i> - spezifischer Sonden	103
3.5.2. Position der Sonden auf dem Microarray	104
3.5.3. Hybridisierung	107
4. DISKUSSION	108
4.1. Im Niedermoor abundante potentielle Fermentierer	108
4.2. Aktive Monosaccharid-abbauende, anaerobe Prokaryoten	115
4.3. Einfluss von Ethanol, Xylose und Glucose auf den anaeroben Kohlenstofffluss	119
4.4. Mikrobielle Populationsstrukturen in Abhängigkeit von der Tiefe und Versuchsfläche	124
4.5. Hypothetisches Modell über die Tiefenzonierung detektierter Prokaryoten	126
4.6. Vergleich von Methoden zur Erfassung einer mikrobiellen Gemeinschaft	130
4.7. Ausblick	132
5. ZUSAMMENFASSUNG	133
6. SUMMARY	135
7. LITERATURVERZEICHNIS	137
8. DANKSAGUNG	153
9. PUBLIKATIONEN	154
9.1. Poster	154
9.2. Vorträge	154
9.3. Artikel in Zeitschriften mit „Peer-Review“- System	155

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
AA	Acrylamid
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BaCl ₂	Bariumchlorid
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
C/N	Verhältnis von Gesamtkohlenstoff- zu Gesamtstickstoffgehalt
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CH ₄	Methan
cm	Zentimeter
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
CsTFA	Cäsiumtrifluoracetat
Cy3	Sulphoindocyanin-Farbstoff Cy3.29-Osu
Cy5	Cy5.18-Derivat (N-hydroxysuccinimidester)
d. h.	das heißt
ddH ₂ O	doppelt entsalztes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e ⁻	Elektron
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH _{abs}	Ethanol absolut
Fe	Eisen
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
Gt	Gigatonne

H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
<i>HaeIII</i>	Restriktionsendonuklease mit tetramerer Erkennungssequenz aus <i>Haemophilus aegypticus</i>
HCl	Salzsäure
HCO ₃	Hydrogencarbonatanion
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
km ²	Quadratkilometer
LB	Luria Broth, Nährmedium
M	molar (mol/l)
m	Meter
mbar	Millibar
<i>MBN</i>	Mung Bean Nuklease
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mm	Millimeter
Mn	Mangan
mRNA	messenger RNA
<i>n</i>	Stichprobenanzahl
N	Stickstoff
x N	normal
n. z.	nicht zutreffend
N ₂	molekularer Stickstoff
N ₂ O	Distickstoffoxid, Lachgas
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NAD	Nicotinamid Adenin Dinukleotid (oxidiert)
NADH ₂	Nicotinamid Adenin Dinukleotid (reduziert)
NaOH	Natronlauge

NH ⁴⁺	Ammonium
nm	Nanometer
NN	Normalnull
NO ³⁻	Nitrat
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte bei 660 nm
OTU	Operational Taxonomic Unit, künstliche taxonomische Einheit
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen- konzentration
ppb	parts per billion
ppm	part per million
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäuren
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natrium Laurat
SO ₄ ²⁻	Sulfatanion
sp.	Species
T	type strain, in einer Stammsammlung hinterlegter Referenzstamm einer Mikroorganismen-Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>TaqI</i>	Restriktionsenzym aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
T _C	total carbon, Gesamtkohlenstoff
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
T _{Fe}	total iron, Gesamteisen
TG	Trockengewicht
Tg	Teragramm
T _N	total nitrogen, Gesamtstickstoff
T-RF	Terminales Restriktionsfragment
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragment- Längenpolymorphismus

Tris-HCl	α,α,α -Tris(hydroxymethyl)-methylamin-hydrochlorid
TSB	Tryptic Soy Broth
U	units, Aktivitäts-Einheit bei Enzymen
$U\ \mu\text{l}^{-1}$	Units pro Mikroliter
$U\ \text{min}^{-1}$	Umdrehung pro Minute
UF	Urea and Formamide, Harnstoff und Formamid
V	Volt
w/v	weight per volume, Gewicht pro Volumen
WG	Wassergehalt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Vereinfachtes Schema des Kohlenstoffabbaus in einem anoxischen Habitat in Abwesenheit von alternativen Elektronenakzeptoren außer CO ₂	8
Abbildung 1.2	Charakteristische Fermentationsprodukte und deren Bildungswege	9
Abbildung 1.3	Der Acetyl-CoA Wood–Ljungdahl Stoffwechselweg	12
Abbildung 1.4	Schema der Methanogenese aus H ₂ /CO ₂ (A), Acetat (B) und Methanol (C)	15
Abbildung 2.1	Lage des Untersuchungsstandortes Schlöppnerbrunnen im Wassereinzugsgebiet Lehstenbach im nördlichen Fichtelgebirge	18
Abbildung 3.1	Flussdiagramm über die Isolierungsansätze von potentiellen Fermentierern	64
Abbildung 3.2	Die optischen Dichte (OD, halblogarithmische Auftragung, A) und CO ₂ Konzentrationen (B) der Isolate in Medien mit 1 mM Glucose bei einer Inkubationstemperatur von 30°C unter oxischen (ox) oder anoxischen (a) Bedingungen	66
Abbildung 3.3	Einfluss von 1 mM Glucose auf das anaerobe Wachstum der Isolate 1S-9Ac, 1S-8Ah, 1GF-2a und 2X-6Bb nach 6 Tagen Inkubation bei 30°C	67
Abbildung 3.4	CO ₂ - (A), CH ₄ - (B) und H ₂ -(C) Konzentrationen in anoxischen Inkubationen mit Ethanol und ohne Substrat (Kontrollen) bei 15°C	71
Abbildung 3.5	Produktion von organischen Säuren in Inkubationen mit Ethanol (A) und ohne Substrat (Kontrollen) bei 15°C (B)	72
Abbildung 3.6	Einfluss von Xylose- (A1) und Glucose- (B1) Konzentrationen auf die Produktion von organischen Säuren (A2, B2), CO ₂ , H ₂ , und CH ₄ (A3, B3) in anoxischen Bodenaufschlammungen	74
Abbildung 3.7	1% Agarosegel mit amplifizierten <i>Bacteria</i> -16S rRNA Genen der Fraktionen 4-11 der Inkubation mit Glucose zu Tag 2 (G2) und 13 (G13) für DGGE-Analyse	76
Abbildung 3.8	DGGE-Profile von amplifizierten <i>Bacteria</i> -16S rRNA Genen der Fraktionen 4–11 der Xylose-Inkubation am Tag 4 (A) und 13 (B)	76

Abbildung 3.9	DGGE-Profile der amplifizierten <i>Bacteria</i> -16S rRNA Gene der Fraktionen 4–11 der Glucose-Inkubation am Tag 2 (A) und 13 (B)	77
Abbildung 3.10	DGGE-Profile von amplifizierten <i>Archaea</i> -16S rRNA Genen der Fraktionen 4-11 der Xylose-Inkubation am Tag 4 (A) und 13 (B)	78
Abbildung 3.11	1% Agarosegel mit bakterienspezifischen Primern 27F/907R amplifizierter cDNA von Fraktion 4 der Glucose (G)- und Xylose (X)- Inkubation zu den Probenahmezeitpunkten Tag 2, 4 und 13	79
Abbildung 3.12	Rarefaction Analyse der Genbibliotheken von „schwerer“ RNA aus den Xylose- Inkubationen zu Tag 4 und 13 und aus den Glucose-Inkubationen zu Tag 2 und 13	80
Abbildung 3.13	T-RFLP Profile von amplifizierten <i>Bacteria</i> -16S rRNA Genen der „schweren“ Fraktion 4 und der „leichten“ Fraktion 10 aus dem ¹³ C-Xylose-Experiment (A) oder dem ¹³ C-Glucose-Experiment (B) zu Tag 2 (A1), 4 (B1) und 13 (A2, B2)	83
Abbildung 3.14	Phylogenetischer Konsensusbaum von <i>Bacteria</i> -16S rRNA Sequenzen, die in den „schweren“ Fraktionen des ¹³ C-Xylose- und Glucose-Experiments zum frühen und späten Probenahmezeitpunkt detektiert wurden	84
Abbildung 3.15	Phylogenetischer Konsensusbaum von <i>Archaea</i> -16S rRNA Gensequenzen vom Tag 13 des ¹³ C-Xylose Experiments	87
Abbildung 3.16	Ausschnitte eines 1% Agarosegels mit extrahierter DNA der Flächen K4-K6, A4-A6 und der Tiefen 0-10 (1), 10-20 (2), 20-30 (3) und 30-40 (4) cm	88
Abbildung 3.17	DGGE-Profile von amplifizierten <i>Bacteria</i> - (A) und <i>Archaea</i> - (B) 16S rRNA Genen der Versuchsflächen K4-6 (Kontrollflächen 4-6) und A4-6 (Manipulationsflächen 4-6) aus den Tiefen 1 (0-10 cm), 2 (10-20 cm), 3 (20 -30 cm) und 4 (30-40 cm)	89
Abbildung 3.18	Dendrogramme von DGGE-Profilen mit amplifizierten <i>Bacteria</i> - (A) und <i>Archaea</i> - 16S rRNA Genen (B)	90
Abbildung 3.19	Rarefaction Analyse von <i>Bacteria</i> - und <i>Archaea</i> -16S rRNA Genbibliotheken	92

Abbildung 3.20	T-RFLP Profile von amplifizierten <i>Bacteria</i> (A) und <i>Archaea</i> - (B) 16S rRNA Genen der unterschiedlichen Tiefen und gemittelten Probenahmestandorten (K4-6 und A4-6)	94
Abbildung 3.21	Phylogenetischer Konsensusbaum von <i>Bacteria</i> -16S rRNA Genen	98
Abbildung 3.22	Phylogenetischer Konsensusbaum von <i>Archaea</i> -16S rRNA Genen	102
Abbildung 3.23	Schematische Darstellung des Phylochips	105
Abbildung 3.24	Mikroskopische Aufnahmen der gespotteten Sonden in 40-facher (A) und 100-facher (B) Vergrößerung	106
Abbildung 3.25	Gescannte Mikroarraybilder der Wellenlänge 532 nm, die das gebundene, Cy3-markierte CONT-COMP Oligonukleotid detektieren (A) und der Wellenlänge 635 nm, die das gebundene Cy5-markierte Poly A-Oktamer (B) detektieren	107
Abbildung 4.1	Vereinfachtes hypothetisches Modell des anaeroben Kohlenstoffflusses und der beteiligten aktiven Prokaryoten im Niedermoor	123
Abbildung 4.2	Hypothetisches Modell über die mikrobielle Populationsstruktur und Funktionsbeziehungen in den Tiefenzonen 0-10, 10-20, 20-30 und 30-40 cm im Niedermoor	129
Abbildung 4.3	Schematische Darstellung der durch Kultivierung, SIP und direkter 16S rRNA Genanalyse detektierten phylogenetischen Gruppen	131

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Fermentationstypen	10
Tabelle 1.2	Methanogene Reaktionen	14
Tabelle 2.1	Probenahmeterminen und Verwendungszweck der Bodenproben	20
Tabelle 2.2	Physikalisch-chemische Parameter des Moorbodens	21
Tabelle 2.3	Bedingungen und Geräte der Gaschromatographie	22
Tabelle 2.4	Bunsensche Löslichkeitskoeffizienten α verschiedener Gase in Wasser bei 15°C und 20°C	23
Tabelle 2.5	Verwendete Stammkulturen, deren Inkubationsbedingungen, Medien und Herkunft	32
Tabelle 2.6	Verwendete Primer und deren Zielgruppe 16S rRNA Position, Sequenz und Schmelztemperatur	39
Tabelle 2.7	Volumina der PCR-Reagenzien pro 50 µl-Ansatz	41
Tabelle 2.8	Für PCR verwendete Programme	41
Tabelle 2.9	Zusammensetzung des 50 x TAE-Puffers	43
Tabelle 2.10	Zusammensetzung der Lösungen für unterschiedliche DGGE-Gradienten	44
Tabelle 2.11	Zusammensetzung des verwendeten 5 x TBE-Puffers	46
Tabelle 2.12	Verwendete Restriktionsenzyme, Puffer und Inkubationsbedingungen	47
Tabelle 2.13	Verwendete und bereits etablierte Sonden	52
Tabelle 2.14	Eingestellte Spotter Parameter	53
Tabelle 2.15	Zusammensetzung des verwendeten Hybridisierungspuffers	54
Tabelle 2.16	Verwendete Gase und ihre Reinheit	56
Tabelle 3.1	Detektierte organische Verbindungen in anoxischen Anreicherungskulturen	60
Tabelle 3.2	Phylogenetische Zuordnung der klonierten repräsentativen 16S rRNA Gene der Anreicherung, deren Ursprung und Substrat	62
Tabelle 3.3	Phylogenetische Zuordnung der Isolate, deren Ursprung, Substrat, Kolonie- und Zellmorphologie	68

Tabelle 3.4	Detektierte T-RFs, ihre repräsentativen Klone und ihre Ähnlichkeit zu der nächsten Sequenz und der nächsten kultivierten Art	82
Tabelle 3.5	Detektierte T-RFs, ihre repräsentativen Klone und ihre Ähnlichkeit zu der nächsten Sequenz und der nächsten kultivierten Art	95
Tabelle 3.6	<i>In silico</i> entwickelte Sonden, deren phylogenetische Zielgruppe, Sequenz, kalkulierte Schmelztemperatur (T_m) und Bindungsenthalpie ΔG	104
Tabelle 3.7	Anordnung aller ausgewählten Sonden auf dem Microarray	105

1. EINLEITUNG

1.1. Das Treibhausgas Methan

Treibhausgase (z. B. CO_2 , N_2O und CH_4) in der Erdatmosphäre absorbieren langwellige Infrarotstrahlung, die von der Erdoberfläche, der Atmosphäre und von den Wolken abgestrahlt werden, anstatt sie in den Weltraum entweichen zu lassen (Tyler, 1991). Ihre Wirkungsweise gleicht somit einer, die Erde umgebenden, Glasglocke. Die Erde kann dadurch weniger Energie abgeben als sie von der Sonne aufnimmt. Es entsteht eine unausgeglichene Energiebilanz, die eine Erwärmung der Erde bewirkt (Tyler, 1991). Diese Klimaerwärmung ist gekennzeichnet durch steigende Luft- und Meerestemperaturen, Schnee- und Eisschmelze und das Ansteigen des Meeresspiegels (Pacchauri & Reisinger, 2007). Zwischen 1995-2006 waren 11 Jahre unter den 12 wärmsten der bisher aufgezeichneten globalen Oberflächentemperaturen (seit 1850; Pacchauri & Reisinger, 2007). Die Gesamttemperatur stieg von 1850-1899 bis 2001-2005 um 0.75°C (Pacchauri & Reisinger, 2007). Die für diesen Anstieg verantwortliche globale Treibhausgasemission stieg um 70% von 1970 bis 2004 (Pacchauri & Reisinger, 2007).

CH_4 trägt bis zu 15% zum Treibhausgaseffekt bei und ist somit nach Kohlendioxid (60%) das zweit-wichtigste Treibhausgas (Rodhe, 1990). Die weltweite atmosphärische CH_4 Konzentration stieg von 715-1732 ppb in den frühen 1990ern auf 1774 ppb in 2005 an (Pacchauri & Reisinger, 2007). Die jährliche CH_4 -Emission ist zu 55-70% anthropogenen Ursprungs. Unter den natürlichen CH_4 -Quellen sind Feuchtgebiete am bedeutendsten, aufgrund der anoxischen Bedingungen, die CH_4 -produzierende Mikroorganismen begünstigen (Wang et al., 1996). Die gesamte Fläche an Feuchtgebieten wird auf 5.3 bis $5.7 \times 10^9 \text{ km}^2$ geschätzt, was nur ungefähr 5% der Erdoberfläche ausmacht (Wang et al., 1996). Jedoch emittieren sie jährlich 115-147 Tg CH_4 , das ca. 25% der globalen Emission entspricht (Wahlen, 1993).

1.2. Der Kohlenstofffluss zu Methan in Mooren

1.2.1. Ökologie von Feuchtgebieten

Feuchtgebiete sind charakterisiert durch eine temporäre bis permanente Vernässung des Bodens (Moore, 1990; Westermann, 1993). Nach der Ramsar Konvention (Übereinkommen über Feuchtgebiete, 1975, www.ramsar.org) liegt eine Unterteilung in marine (Wattenmeer, Lagunen), estuarine (Deltas, Salzmarsche), lacustrine (Verlandungszone von Seen), riverine (Auengebiete) und palustrine (Sümpfe, Moore) Feuchtgebiete vor. Palustrine Feuchtgebiete entstehen bei einer Überschwemmung durch Flüsse oder Seen von tiefer gelegenem Gelände, wobei die Entwässerung des Bodens durch ein undurchlässiges Felsenbett, einer Lehmschicht, oder einer geringeren Verdunstung als der jährliche Niederschlag, verhindert wird. Organisches Material akkumuliert aufgrund der anoxischen Bedingungen z. B. an seichten Stellen von Flüssen und führt zu einer Entwicklung von bestimmten Moortypen (Westermann, 1993).

Moore werden anhand der Wasserversorgung und dem Nährstoffgehalt in Hochmoore und Niedermooere unterteilt. Hochmoore sind sehr sauer (pH 3-4) und hauptsächlich von *Sphagnum* Arten oder anderen Moosen (z. B. *Polytrichum* sp.; Westermann, 1993; Trckova et al., 2005) bewachsen. Ihre Wasserversorgung beruht ausschließlich auf Niederschlägen (ombrotroph), woraus eine niedrige Salinität und Nährstoffarmut (oligotroph) beruht (Westermann, 1993). Niedermooere sind alkalisch, neutral, oder leicht sauer, da sie von mineralstoffreichem Grundwasser (minerotroph) versorgt werden (Westermann, 1993). Sie sind von höheren Pflanzen, wie Seggen (*Carex* sp.), Schachtelhalm (*Equisetum* sp.), Kiefer (*Pinus* sp.) oder Fichte (*Picea* sp.) und einige Moosarten (*Sphagnum* sp.) bewachsen (Trckova et al., 2005). Niedermooere werden zusätzlich anhand ihres Nährstoffgehalts differenziert in oligotroph (pH \approx 4,5), mesotroph (Übergangsstadium zwischen oligotroph und eutroph; pH \approx 5,5) und eutroph (nährstoffreich, pH 5,5-7,5; Westermann, 1993; Eurola et al., 1984).

Moorböden speichern etwa 30% des globalen terrestrischen Kohlenstoffs (Gorham, 1991). In den nördlichen Breitengraden haben Moore bislang etwa 450 Gt Kohlenstoff akkumuliert und sind daher von besonderer Bedeutung für den globalen Kohlenstoffkreislauf (Maltby & Immirzi, 1993; Moore et al., 1998). Die

Moorbodenzusammensetzung ist abhängig von Vegetation, Mikroorganismen, Grundwasserqualität und von Sekundärstoffen, die während der Dekomposition produziert werden (Trckova et al., 2005). Organisches Material unterteilt sich zu 5-10% in wasserlösliche Stoffe (Polysaccharide, Monosaccharide), zu 5-15% in Ether und Alkohol-lösliches Material (Fettsäuren, Kohlenhydrate), zu 5-40% in Cellulose und Hemicellulosen, zu 20-50% in Lignin und aus Lignin gewonnene Substanzen und zu 0,3-0,4% in stickstoffhaltige Verbindungen (Proteine; Trckova et al., 2005). Andere in Moorböden vorkommende Substanzen sind Huminsäuren und aromatische Verbindungen (Trckova et al., 2005). Des Weiteren kennzeichnen Moorböden dynamische Sauerstoffgradienten und geringe Konzentrationen von alternativen Elektronenakzeptoren (z. B. Sulfat, Nitrat, Fe[III], Phosphat; Westermann, 1993). Mit Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Boden sinkt auch das Redoxpotential (Westermann, 1993).

In diversen Moorhabitaten nahm der pH-Wert mit der Tiefe zu (z. B. Cadillo-Quiroz et al., 2006; Paul et al., 2006). Ein geringfügig saurer pH-Wert mit dunklerer Färbung der tieferen Schichten des Moorbodens deutet auf reduzierte Bedingungen hin (Cadillo-Quiroz et al., 2006). Untersuchte Tiefenprofilen innerhalb eines Moores mit Hilfe von Dialysekammern deuteten darauf hin, dass die Redoxprozesse Sulfat-, Eisen-, Manganreduktion und Methanogenese nicht sequenziell sondern gleichzeitig ablaufen (Paul et al., 2006). Der Humifizierungsgrad ist in tieferen Schichten eines Moores stärker, der Boden feinporiger und besitzt daher eine geringe Wasserspeicherkapazität. Aufgrund dieser Tatsache nimmt der Wassergehalt des Moorbodens mit der Tiefe ab (Cadillo-Quiroz et al., 2006). Parallel dazu nimmt auch die Bodentemperatur mit der Tiefe ab (Galand et al., 2002). Biogeochemische Prozesse werden nicht nur von physikalischen und chemischen Parametern eines Moorbodens beeinflusst, sondern auch vom Pflanzenbestand und dessen Zusammensetzung, wobei Gefäßpflanzen die dominierende Kohlenstoffquelle in moorigen Habitaten sind (Nilsson & Bohlin, 1993).

1.2.2. Polymere und Monomere in Mooren

Hauptbestandteile des organischen Materials bzw. der Biomasse in Mooren sind Polymere wie Lignocellulose und Hemi-/Celullose (Trckova et al., 2005), aber auch Stärke und andere Zuckerderivate oder proteinhaltige Verbindungen spielen im Kohlenstofffluss eines Moores eine bedeutende Rolle (Westermann, 1993; Kotsyurbenko, 2005). Im Folgenden werden einige Biopolymere beschrieben, auf die sich die Untersuchungen dieser Arbeit konzentrieren.

Lignocellulose ist verantwortlich für die Festigkeit von Pflanzen und macht bis zu 90% des Trockengewichts von Pflanzenmaterial aus (Ahmed, 2001). Es setzt sich aus Lignin, Hemicellulose und Cellulose zusammen (Ahmed et al., 2001). Hemicellulosen sind Gemische aus fünffach und sechsfach Zuckern bzw. Zuckerderivaten (Ahmed et al., 2001). Der Hauptbestandteil ist Xylan, ein Heteropolymer aus β -1,4-glykosidisch verknüpften β -D-Xylosen und diversen anderen Zuckern an seinen Seitenästen (Ahmed et al., 2001). Der Abbau kann unter oxischen und anoxischen Bedingungen über die Enzyme *endo*-Xylanase und β -Xylosidase erfolgen. Diese Enzyme können viele Spezies innerhalb der Domäne *Bacteria*, vor allem jedoch innerhalb der *Clostridia* synthetisieren (Mitchell, 1998).

Cellulose besteht aus langen, unverzweigten D-Glucose-Einheiten, die β -1,4-glykosidisch verknüpft sind. Die Regelmäßigkeit dieser Strukturen erlaubt eine Aneinanderreihung dieser Ketten, dass zu einer Bildung von Mikrofibrillen führt, die eine kristallähnliche Struktur besitzen (Ahmed et al., 2001). Mikrofibrillen können sich zu Makrofibrillen bündeln, wodurch zusätzlich zu Lignin holziges Material seine Festigkeit erhält (Ahmed et al., 2001). Einige Arten innerhalb der Protozoen, Pilzen und der Domäne *Bacteria* z. B. der Phyla *Firmicutes* und *Fibrobacteres* synthetisieren cellulolytische Enzyme (Flint, 1997; Schwarz, 2001; Desvaux, 2005). Bei Temperaturen $\leq 15^{\circ}\text{C}$ findet ein verminderter mikrobieller Cellulose-Abbau statt, der hauptsächlich von bereits akkumulierten, hydrolytischen Bakterien durchgeführt wird (Kotsyurbenko, 2005). Unter diesen Bedingungen wird Cellulose v. a. zu Acetat und Propionat abgebaut (Kotsyurbenko, 2005).

Lignin ist ein sehr komplexes Biopolymer, dass keine stereochemische, regelmäßige Struktur besitzt (Ahmed et al., 2001) und in den Sekundärlamellen der Pflanzenzellwände vorliegt (Schlegel, 1992). Es besteht aus der Untereinheit Lignol.

Diese Untereinheiten sind Arylpropanole, die sich aus einem aromatischen Ring und 3 Kohlenstoffketten zusammensetzen (Ahmed et al., 2001). Die Struktur der Lignole wird von den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin abgeleitet (Ahmed et al., 2001). Innerhalb des Moleküls gibt es viele C-C-Bindungen und Ether-Brückenbindungen, die schwer abgebaut werden können. Die Mineralisierung erfolgt in Feuchtgebieten größtenteils in der oxischen Zone und wird vor allem von Pilzen durchgeführt (Ahmed et al., 2001; Williams & Crawford, 1983). Der Abbau von lignifizierten Verbindungen in der anoxischen Zone verläuft sehr langsam (Zeikus, 1981) und spielt daher für Mikroorganismen in Moorböden für die Konservierung von Energie eine unbedeutende Rolle.

Stärke ist ein weit verbreitetes Biopolymer bestehend aus langen α -D-Glucose-Ketten (Nigam & Singh, 1995). Es kommt als unlösliches Granulat in vielen Pflanzen vor und baut sich in einigen Pflanzen aus ca. 30% Amylose und 70% Amylopektin zusammen. Amylose ist ein lineares Molekül aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucose-Einheiten. Amylopektin dagegen besitzt eine stark verzweigte Struktur aus α -1,6-glycosidisch verknüpften Glucose-Einheiten (Nigam & Singh, 1995). Der enzymatische Abbau von Stärke erfolgt hauptsächlich über Glucanasen und Amylasen, die von einigen Pilzen, Hefen und Bakterien der Klassen *Bacilli* und *Actinobacteria* synthetisiert werden (Nigam & Singh, 1995). Bei niedrigen Temperaturen wird Stärke zu Acetat, Butyrat und H_2 abgebaut, wodurch der pH sinkt und Acetat und Butyrat lange Zeit stabil bleiben (Kotsyurbenko, 2005).

Pektin, ein Hauptbestandteil der Mittellamelle von Pflanzenzellen, ist ein ebenfalls häufig vorkommendes Biopolymer. Die Hauptkette besteht zum Teil aus Methyl-verestertem-1,4-D-Galacturonan. An der C_2 - und C_6 -Position der Hauptkette befinden sich Substituenten, wie Acetyl-Gruppen oder bestimmte Zucker (z. B. D-Xylose, D-Galactose; Hoondal et al., 2002). Pektin wird durch Pektinasen abgebaut, die Pilze, Hefen und Bakterien der Klassen *Bacilli* und *Actinobacteria* synthetisieren (Hoondal et al., 2002).

Mannitol ist ein C_6 -Zucker-Alkohol, der in der Vakuole und dem Cytosol höherer Pflanzen vorkommt (Stoop et al., 1996). Mannitol dient als Speichermolekül. Da chemisch reduzierte Verbindungen mehr Energie beinhalten als die jeweilige oxidierte Form, reduziert die Pflanze den C_6 -Zucker Mannose zu Mannitol (Stoop et

al., 1996). Mannose wird von Pilzen und vielen Prokaryoten als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt (z. B. Stewart et al., 1995; Lawford & Rousseau, 1993).

Zusätzlich kommen auch andere Polymere, wie Proteine (z. B. Gelatine) in Mooren vor, die von abgestorbener Biomasse (z. B. Tiere) stammen (Kotsyurbenko, 2005). Diese werden unter anoxischen Bedingungen zu einer Vielzahl verschiedener löslicher Fettsäuren (C_2 - C_6 , v. a. Acetat, Propionat und Butyrat) und ihrer Isomere abgebaut (Breure et al., 1986; Kotsyurbenko, 2005). Die Freisetzung von Ammonium neutralisiert die produzierten Fettsäuren und kann in einem Medium den pH stabil halten (Kotsyurbenko, 2005).

1.2.3. Biogeochemische Prozesse in Mooren

Der Kohlenstoffeintrag erfolgt zum einen über den Abbau abgestorbenen Pflanzenmaterials und zum anderen über Exsudate, die von den Wurzeln ausgeschieden werden (van Veen et al., 1989). Da das organische Material hauptsächlich über die Oberfläche und oberflächennahe Bereiche des Moorbodens eingetragen wird, ist eine Abnahme des Kohlenstoffgehalts mit der Tiefe zu beobachten (Paul et al., 2006). Die oxische Zone eines wassergesättigten Bodens ist sehr begrenzt. Sie liegt oberhalb des Wasserspiegels und reicht nur wenige Zentimeter tief in den darunter liegenden Boden. Für die Stärke und Tiefe des Sauerstoffeintrags in den Boden sind Pflanzenwurzeln verantwortlich (Westermann, 1993; Gutknecht et al., 2006). Einige Gefäßpflanzen besitzen ein kortikales Sauerstofftransportsystem (Aërenchym) in den Wurzeln (Lüttge et al., 1999), wodurch Sauerstoff in die unteren Moorbodenzone diffundiert und demzufolge dort aerobe Prozesse stattfinden können (Stephen et al., 1998; Conrad, 1996).

Im oxischen Bereich mineralisieren vor allem Pilze, Protozoen und fakultative oder obligate aerobe Prokaryoten organisches Material (Westermann, 1993). Unter anoxischen Bedingungen dienen alternative terminale Elektronenakzeptoren der Oxidation von organischer Substanz. Sind mehrere Elektronenakzeptoren vorhanden, läuft theoretisch derjenige metabolische Prozess zuerst ab, der thermodynamisch die meiste Energie liefert. Daraus ergibt sich ein sequenzieller Verbrauch von Elektronenakzeptoren mit abnehmendem Redoxpotential nach folgender Reihenfolge: O_2 , NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} und HCO_3^- (Zehnder & Stumm,

1988). Die Fähigkeit nur bestimmte terminale Elektronenakzeptoren nutzen zu können, legt das Wachstum unterschiedlicher mikrobieller Populationen fest (z. B. Sulfatreduzierer, Denitrifikanten). Jedoch sind Moore überwiegend anoxische Systeme mit relativ niedrigen Konzentrationen an alternativen Elektronenakzeptoren (Paul et al., 2006; Westermann, 1993; Moore, 1990), weshalb ein Großteil des organischen Materials durch anoxische Prozesse wie Fermentation und Methanogenese abgebaut wird (z. B. McInerney & Bryant, 1980 und 1981; Zinder, 1993; Schink, 1997).

Unter anoxischen Bedingungen werden komplexe Polymere wie Cellulose oder Lignin durch Exoenzyme primärer Fermentierer zu Oligomeren bzw. Monomeren hydrolysiert (z. B. Glucose, Xylose; Abbildung 1.1). Monomere, wie Xylose oder Glucose, bauen primäre Fermentierer (wie fakultative Aerobier oder obligate Anaerobier) zu organischen Säuren, Alkoholen, CO_2 und H_2 ab. Syntrophe, sekundäre Fermentierer, wiederum bauen einen Teil dieser organischen Säuren und Alkohole zu Acetat, CO_2 und H_2 ab, wobei sie auf einen niedrigen H_2 -Partialdruck im Boden angewiesen sind, da nur dann sekundäre Fermentationsprozesse ablaufen können und ausreichend Energie konserviert werden kann (McInerney et al., 2008). Durch einen Interspezies H_2 oder Formiat-Transfer erhalten Methanogene, die v. a. H_2/CO_2 und Formiat nutzen (hydrogenotroph) die H_2 - oder Formiat- Konzentrationen niedrig (McInerney et al., 2008). Dadurch besteht eine mutualistische Beziehung zwischen Syntrophen und Methanogenen (McInerney et al., 2008). Acetogene stehen in Konkurrenz mit einerseits primären Fermentierern um Monosaccharide und andererseits mit sekundären Fermentierern um primäre Fermentationsprodukte, wie z. B. Lactat, Ethanol und H_2 (Schink, 1994). Bei einer Limitation von alternativen terminalen Elektronenakzeptoren ist Methanogenese der dominierende terminale Elektronen-akzeptierende Prozess im anaeroben Kohlenstofffluss (Horn et al., 2003; Schink, 1997). Acetat und H_2/CO_2 werden als die dominierenden Vorläufer bei der Bildung von Methan in anoxischen Habitaten betrachtet (Conrad, 1999; Zinder, 1993). Jedoch bleibt umstritten, ob eine Acetat- (acetoclastische) oder H_2/CO_2 -basierende (hydrogenotrophe) Methanogenese der dominierende CH_4 -bildende Prozess in Mooren ist (Galand et al., 2005; Horn et al., 2003; Kotsyurbenko et al., 2004).

In Mooren ist die CH_4 -Emission stark abhängig von der Verfügbarkeit anorganischer Elektronenakzeptoren, organischem Kohlenstoff und H_2/CO_2 für Methanogene, sowie von bestimmten Umweltfaktoren, wie pH-Wert, Temperatur und Grundwasserspiegel (Segers, 1998; Zinder, 1993). Moorböden sind demzufolge komplexe Systeme, deren Prozesse von vielen chemischen, biochemischen und physikalischen Parametern beeinflusst werden. Bislang ist wenig darüber bekannt, wie diese Parameter die mikrobielle Populationsstruktur in Moorböden beeinflusst.

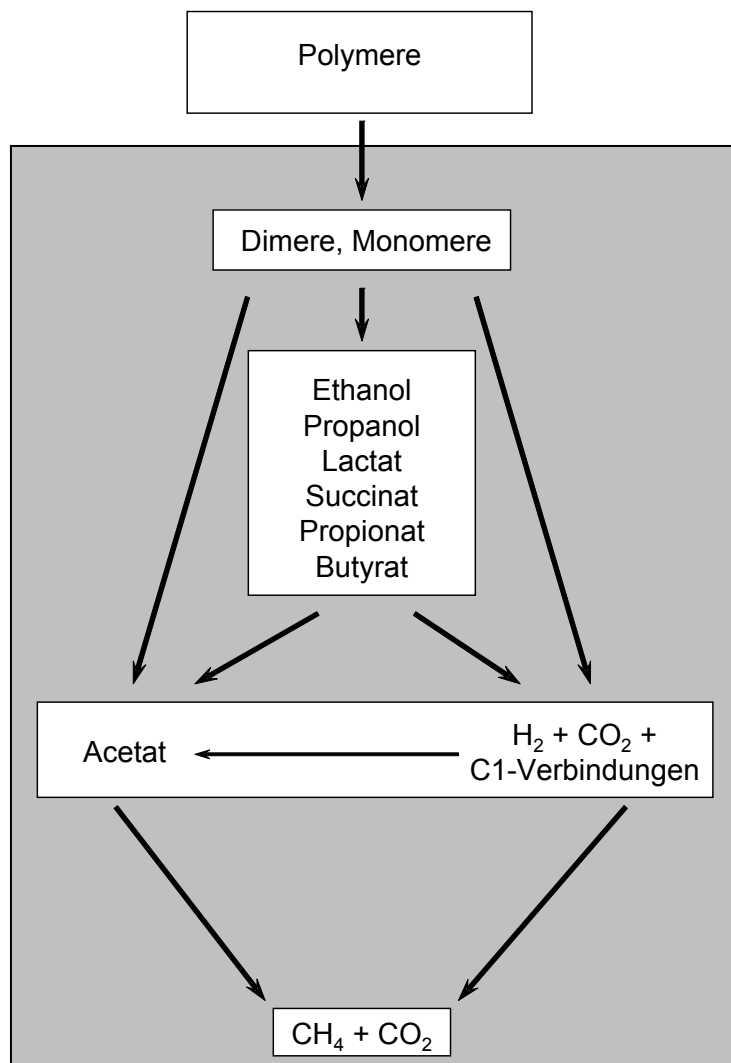


Abbildung 1.1: Vereinfachtes Schema des Kohlenstoffabbaus in einem anoxischen Habitat in Abwesenheit von alternativen Elektronenakzeptoren außer CO_2 (z. B. Nitrat, Sulfat) (verändert nach Drake & Küsel, 2003; McInerney & Bryant, 1981). Der graue Hintergrund beschreibt die Prozesse des intermediären Stoffwechsels durch fakultativ aerobe oder obligat anaerobe Fermentierer, Acetogene, Syntrophe und Methanogene.

1.3. Am anaeroben Kohlenstofffluss beteiligte mikrobielle Prozesse

1.3.1. Fermentation

Fermentation ist ein ATP-regenerierender Stoffwechselprozess, bei dem Spaltprodukte des organischen Substrats zugleich als Elektronen- Donatoren und Akzeptoren dienen (Schlegel, 1992). Kohlenstoff wird innerhalb einer organischen Verbindung teilweise oxidiert und teilweise reduziert. Oxidationsschritte sind Dehydrogenierungen, wobei der Wasserstoff auf NAD übertragen wird (Schlegel, 1992). Die Zwischenprodukte des Substratabbaus fungieren nun als Akzeptoren des Wasserstoffs (in Form von NADH_2), wobei die Regeneration des NAD durch deren Reduktion stattfindet (Schlegel, 1992). Die ATP-Synthese findet durch Substratkettenphosphorylierung statt. Hierbei wird die Energie instabiler Zwischenprodukte in der Bildung von Phosphorsäureanhydridbindungen zwischen Phosphatresten und ADP konserviert. Die Regeneration von ATP kann in 3 möglichen Reaktionen erfolgen, die von *Phosphoglycerat-Kinase*, *Pyruvat-Kinase* und *Acetat-Kinase* katalysiert werden (Schlegel, 1992). So werden bei der Vergärung von Glucose nur 1-4 mol ATP regeneriert (Schlegel, 1992). Es werden hauptsächlich Kohlenhydrate über den Embden-Meyerhof-Weg (Glykolyse) oder den Entner-Doudoroff-Weg (KDPG-Weg) zu Pyruvat (markiert als * in Abbildung 1.2) und danach zu unterschiedlichen Fermentationsprodukten umgewandelt (Abbildung 1.2).

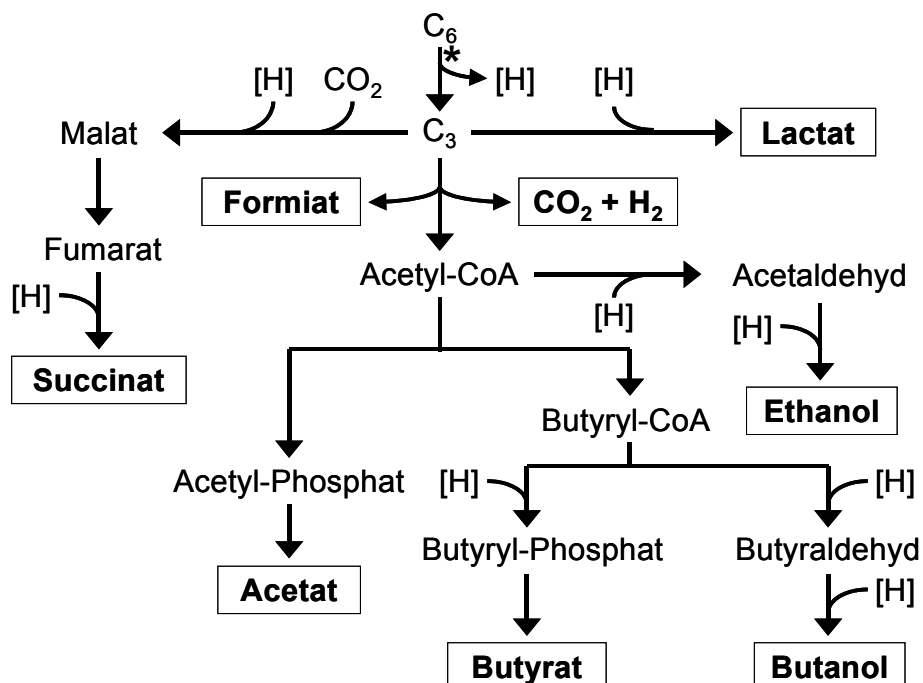


Abbildung 1.2: Charakteristische Fermentationsprodukte (fett gedruckt und umrahmt) und deren Bildungswege. Der jeweilige Stoffwechselweg und Produkte sind abhängig von *in situ* Bedingungen und Spezies. C₆, Hexosen; C₃, Pyruvat oder Phosphoenolpyruvat; CoA, Coenzym A; [H], Reduktionsäquivalente; *, Glycolyse oder KDPG-Weg. Basierend auf Buckel, 2005; Dürre, 2005a und Gottschalk, 1986.

Bei Eukaryoten (Pilzen) und Prokaryoten (*Archaea* und *Bacteria*) ist die Fähigkeit, Energie über Fermentationsprozesse zu konservieren, weit verbreitet (Skinner, 1975). Diese fakultativen Aerobier oder Anaerobier und obligaten Anaerobier können ein breites Substratspektrum über verschiedene Fermentationswege abbauen (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Fermentationstypen (nach Madigan et al., 2006; Schlegel, 1992; Gottschalk, 1986, Thauer et al., 1968).

Fermentationstyp	Reaktionen ^a	Beispielorganismen
Alkoholische Fermentation	Hexosen → 2 Ethanol + 2 CO ₂	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Propionsäure-Fermentation	Laktat ⁻ → Propionat ⁻ + Acetat ⁻ + CO ₂	<i>Clostridium propionicum</i>
Gemischte Säurefermentation	Hexosen → Ethanol + 2,3-Butandiol + Succinat ²⁻ + Laktat ⁻ + Acetat ⁻ + Formiat ⁻ + H ₂ + CO ₂	<i>Escherichia coli</i>
Buttersäure-Fermentation	Hexosen → Butyrat ⁻ + Acetat ⁻ + H ₂ + CO ₂	<i>Clostridium butyricum</i>
Butanolfermentation	Hexosen → Butanol + Acetat ⁻ + Aceton + Ethanol + H ₂ + CO ₂	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
Ethanolfermentation	Ethanol + Acetat → Butyrat + H ₂	<i>Clostridium klyveri</i>
Capronsäure-Fermentation	Ethanol + Acetat ⁻ + CO ₂ → Caproat ⁻ + Butyrat ⁻ + H ₂	<i>Clostridium klyveri</i>
Milchsäure-Fermentation	Homofermentativ: Hexose → 2 Laktat ⁻ + 2 H ⁺ Heterofermentativ: Hexose → Laktat ⁻ + Ethanol + CO ₂ + H ⁺	<i>Streptococcus salivarius</i> <i>Lactobacillus brevis</i>

^a nicht stöchiometrisch ausgeglichen

Fermentierer spielen in der Industrie eine wichtige Rolle, da sie in der Produktion und Veredelung von Nahrungsmitteln sowie in der Lösemittelproduktion Verwendung finden (Schlegel, 1992). Fermentierer kommen in vielen unterschiedlichen Habitaten, wie im Pansen von Wiederkäuern, im Darmtrakt von Mensch und Tier sowie in Böden von Feuchtgebieten vor. In Böden findet Fermentation hauptsächlich durch fakultative Anaerobier, Clostridien und obligate Anaerobier statt (Küsel et al., 1999; Skinner, 1975).

1.3.2. Acetogenese

Acetogene sind Anaerobier, die den Acetyl-CoA Stoffwechselweg (Abbildung 1.3) zur (1) reduktiven Synthese des Acetyl-Anteils von Acetyl-CoA aus CO₂, (2) Konservierung von Energie und (3) Assimilierung von CO₂ zu Biomasse nutzen (Drake et al., 2008). Sie werden nicht nach der für sie charakteristischen Produktion von Acetat definiert, da die Acetat Bildung nur bedingt stattfindet und abhängig von dem jeweiligen Acetogenen und den Wachstumsbedingungen ist (Drake et al., 2008). Jedoch kann man davon ausgehen, wenn ein Organismus Acetat als einziges Endprodukt bildete, dass dies über den Acetyl-CoA Stoffwechselweg stattfand und dieser Organismus acetogen ist (Drake et al., 2008).

22 Gattungen innerhalb der *Bacteria* wurden Acetogenen bislang zugeordnet (z. B. *Acetonema*, *Clostridium*, *Sporomusa*), die aus diversen Habitaten isoliert wurden (z. B. Sedimente von Feuchtgebieten, Böden; Drake et al., 2008). Das Vorkommen in diversen Habitaten zeigt, dass Acetogene an ein großes Spektrum von unterschiedlichen *in situ* Bedingungen angepasst sind (Drake et al., 2008). Neueste Studien zeigen, dass auch 2 Arten innerhalb der *Archaea* (*Methanosarcina acetivorans* und *Archaeoglobus fulgidus*) den Acetyl-CoA-Weg zur Konservierung von Energie nutzen.

Acetogene sind an diversen trophischen Interaktionen mit anderen Organismen beteiligt und können ein großes Substratspektrum als Elektronendonator nutzen, wie CO, H₂, Kohlenhydrate, Alkohole, organische Säuren, Aldehyde, aromatische Verbindungen und andere organische und halogenierte Verbindungen. Acetogene können vermutlich keine Polymere (z. B. Cellulose und Lignin) abbauen (Drake et al., 2006; Drake & Küsel, 2005; Drake & Küsel, 2003).

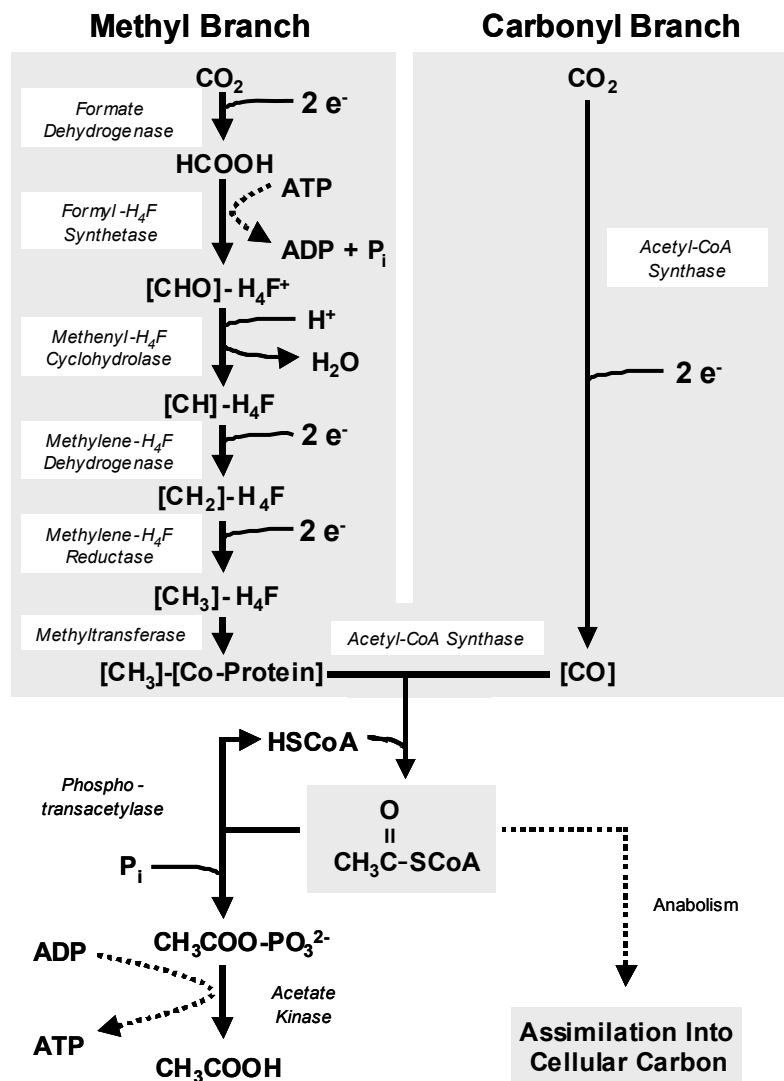


Abbildung 1.3: Der Acetyl-CoA Wood–Ljungdahl Stoffwechselweg. Klammern deuten an, dass eine C_1 - Einheit an den Cofaktor gebunden wird oder mit einem Enzym assoziiert. Kodierung: H_4F , Tetrahydrofolat; HSCoA , Coenzyme A; P_i , anorganisches Phosphat; e^- , Elektron; Co-Protein, Korrinoid-Protein; ATP, Adenosin 5'-Triphosphat (nach Drake et al., 2008).

Die Bedeutung von Acetogenen in sauren Feuchtgebieten ist bislang noch relativ unklar (Conrad, 1999). Es wird davon ausgegangen, dass Methanogenese der dominierende terminale Elektronen-akzeptierende Prozess ist, da die hydrogenotrophe Bildung von CH_4 thermodynamisch günstiger als Acetogenese ($\Delta G'_0 = -135,6 \text{ kJ pro Mol CH}_4$ und $\Delta G'_0 = -104,6 \text{ kJ pro Mol Acetat}$) und die H_2 -Schwellenkonzentration für Methanogene niedriger ist. Die Entdeckung des Methanogenen *Methanosarcina acetivorans*, der CO über den Acetyl-CoA-Weg zu Acetat und CH_4 reduziert (Drake et al., 2008), zeigt jedoch, dass diese Prozesse

gleichzeitig ablaufen und vor allem physikalisch-chemische Parameter einen großen Einfluss auf das Gleichgewicht haben könnten.

1.3.3. Methanogenese

Anfangs des 20. Jahrhunderts wurde erstmals von H. A. Barker belegt, dass Methanformation in anoxischen wassergesättigten Habitaten auf mikrobiellen Prozessen basiert (Ferry, 1993). Seit damals wurde viel über die mikrobielle Methanproduktion, deren Physiologie und Biochemie und die ausführenden Organismen erforscht.

Methanogenese ist eine anaerobe Atmung, die in ihrer Komplexität andere respiratorische Prozesse weit überschreitet, da 6 Coenzyme und viele membrangebundene Enzymkomplexe synthetisiert werden müssen, die für die Kopplung der Protonen-motorischen-Kraft (proton-motive-force) an die CO_2 Reduktion verantwortlich sind (Hedderich & Whitman, 2006). Methanogene sind Mikroorganismen, die ihre gesamte oder die meiste Energie für Wachstum durch Methanogenese konservieren. Sie bilden eine monophyletische Gruppe innerhalb der Domäne der *Archaea* (Woese et al., 1990) und besitzen einen gemeinsamen Vorfahren innerhalb der *Euryarchaeota* (Hedderich & Whitman, 2006). Gegenwärtig werden Methanogene in 5 Ordnungen und 31 Gattungen unterteilt (Hedderich & Whitman, 2006). Methanogene sind die einzigen kultivierten Archaeen, die bislang in vielen anoxischen Ökosystemen gefunden wurden (Hedderich & Whitman, 2006).

Methanogene werden anhand ihrer Substratverwertung in drei Gruppen eingeteilt: CO_2 -reduzierende, methylo trope und acetoclastische Methanogene (Tabelle 1.2; Boone et al., 1993; Hedderich & Whitman, 2006). Erstere binden CO_2 an spezifische C1-Intermediate und reduzieren es mit einem Elektronendonator, wie H_2 oder Formiat, schrittweise zu CH_4 (Abbildung 1.4 A). Methylo trope Methanogene können CH_4 aus Methanol und Methylaminen bilden, indem die Methylgruppe disproportioniert wird (Abbildung 1.4 C). Ein Teil der Methylgruppen wird zu CO_2 oxidiert, wobei die gewonnenen Reduktionsäquivalente verwendet werden, um die restlichen Methylgruppen zu CH_4 zu reduzieren (Abbildung 1.4 C). Acetoclastische Methanogene übertragen Acetat zunächst auf das Coenzym A, das dadurch aktiviert wird. Anschließend wird das Acetyl-CoA in eine Methyl- und eine Carbonylgruppe

gespalten. Mit den Reduktionsäquivalenten, die bei der Oxidation der Carbonylgruppe erworben wurden, findet schließlich die Reduktion des Methyl-Rests zu CH_4 statt (Abbildung 1.4 B). Coenzym M Reduktase ist am finalen Schritt der Bildung von CH_4 beteiligt und somit Schlüsselenzym der Methanogenese. Die Reaktion von Methyl-Coenzym M ($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$) mit einem zweiten Coenzym (H-S-HTP) findet unter der Bildung von CH_4 und einem Heterodisulfid beider Coenzyme statt (Hedderich & Whitman, 2006). Die ATP-Synthese wird von einem transmembranen Elektronengradienten angetrieben, zu dessen Bildung alle methanogenen Prozesse führen (Blaut, 1994).

Tabelle 1.2: Methanogene Reaktionen (nach Madigan et al., 2006; Hedderich & Whitman, 2006).

Gruppe	Reaktion	Beispielorganismen
CO ₂ -reduzierende Methanogene	hydrogenotroph: $4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	<i>Methanospirillum hungatei</i>
	$4 \text{ Formiat} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	<i>Methanospirillum hungatei</i>
	$2 \text{ Ethanol} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ Acetat}$	<i>Methanogenium organophilum</i>
Methylotrophe Methanogene	$\text{Methanol} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	<i>Methanosphaera stadtmaniae</i>
	$4 \text{ Methanol} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	<i>Methanosarcina barkeri</i>
	$4 \text{ Methylamin} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{ NH}_4^+$	<i>Methanosarcina barkeri</i>
	$2 \text{ Dimethylsulfid} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$	<i>Methanlobus volcani</i>
	$2 \text{ Dimethylamin} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ NH}_4^+$	<i>Methanosarcina barkeri</i>
Acetoclastische Methanogene	$\text{Acetat} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	<i>Methanosaeta concilii</i>

Methanogene sind in anoxischen Habitaten weit verbreitet, wie in Feuchtgebieten, im Darmtrakt von Mensch und Tier sowie als Endosymbionten in Protozoen. Methanogenese findet auch in einigen anthropogenen Habitaten eine wichtige praktische Anwendung, wie in Mülldeponien, in Faultürmen von Kläranlagen und Bioreaktoren (Zinder, 1993). Jedoch ist relativ wenig über Methanogene und deren Funktion in sauren Habitaten bekannt. Das Vorkommen von Methanogenen in Moorböden wurde von einigen Studien belegt (z. B. Cadillo-Quiroz et al., 2006;

Galand et al., 2005; Juottonen et al., 2005), jedoch konnte bislang aus saurem Moorboden nur ein acidophiles methanogenes Isolat kultiviert werden, das einer neuen Gattung innerhalb der *Methanomicrobiales* angehört (Bräuer et al., 2006).

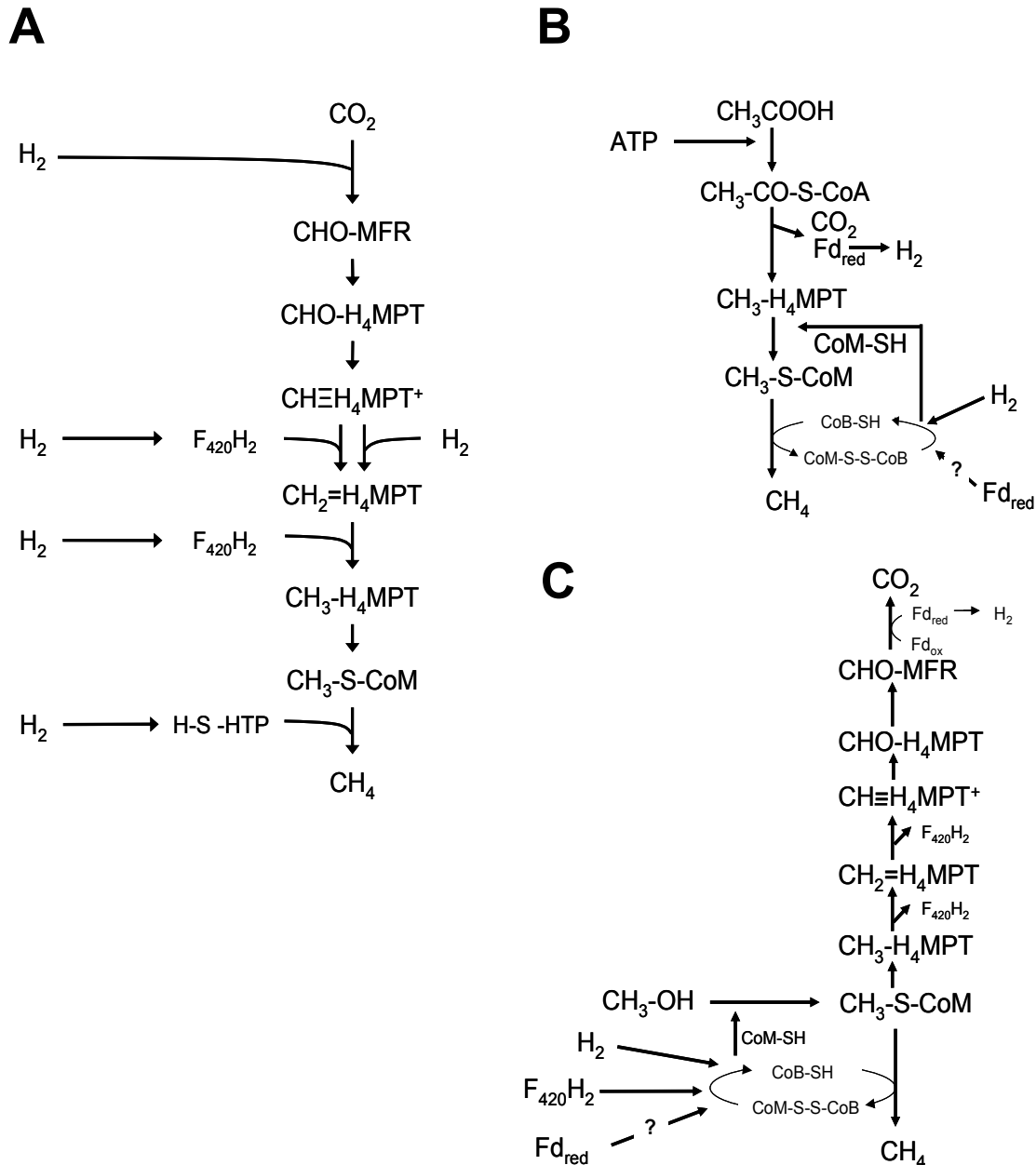


Abbildung 1.4: Schema der Methanogenese aus H_2/CO_2 (A), Acetat (B) und Methanol (C). CHO - MFR, N-Formylmethanofuran; CHO- H_4MPT , N^5 -Formyltetrahydromethanopterin; $\text{CH}\equiv\text{H}_4\text{MPT}^+$, N^5 , N^{10} -Methenyltetrahydromethanopterin; $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{MPT}$, N^5 , N^{10} -Methylentetrahydromethan-opterin; $\text{CH}_3-\text{H}_4\text{MPT}$, N^5 -Methyltetrahydromethanopterin; $\text{CH}_3-\text{S}-\text{CoM}$, Methyl-Coenzym M; H-S-HTP, N-7-Mercaptoheptanoyl-O-phospho-L-Threonin; F_{420}H_2 , reduziertes Coenzym F_{420} ; $\text{Fd}_{(\text{red})}$, (reduziertes) Ferredoxin; CoB-SH, Coenzym B; CoM-S-S-CoB, Heterodisulfid des Coenzym M und B. A basiert nach Thauer et al., 1993; B und C basiert nach Hedderich & Whitman, 2006.

1.4. Hypothese und Zielsetzung

Moore sind bedeutende Kohlenstoffspeicher und emittieren Methan. Fermentation und Methanogenese sind durch die vorherrschenden Bedingungen in Mooren begünstigt. Jedoch ist wenig über die Funktion und Populationsstruktur von Fermentierern und Methanogenen in Mooren bekannt. Am Beispiel eines sauren Niedermoores (pH 4,8) im Fichtelgebirge (Bayern, Deutschland) wurde die Struktur und Funktion von Fermentierern und Methanogenen untersucht. Folgende Hypothese lag zugrunde:

Im gemäßigt sauren Niedermoor sind phylogenetisch diverse, fakultativ aerobe und obligat anaerobe Fermentierer sowie gemäßigt säuretolerante Methanogene aktiv am Kohlenstofffluss beteiligt und räumlich heterogen verbreitet.

Folgende Ziele wurden verfolgt um diese Hypothese zu untersuchen:

1. Anreicherung und Isolierung von fakultativ aeroben und obligat anaeroben Fermentierern.
2. Identifizierung von aktiven Xylose- und Glucose- verwertenden Mikroorganismen sowie von Intermediaten im Kohlenstofffluss zu CH₄ durch 16S rRNA Stable Isotope Probing.
3. Abschätzung der Diversität und Heterogenität der *Bacteria* und *Archaea* durch direkte 16S rRNA Genanalyse und verschiedene „fingerprinting“ Methoden.
4. Eine schnelle Detektion der *Archaea* im Niedermoor durch die Entwicklung eines RNA Micoarrays.

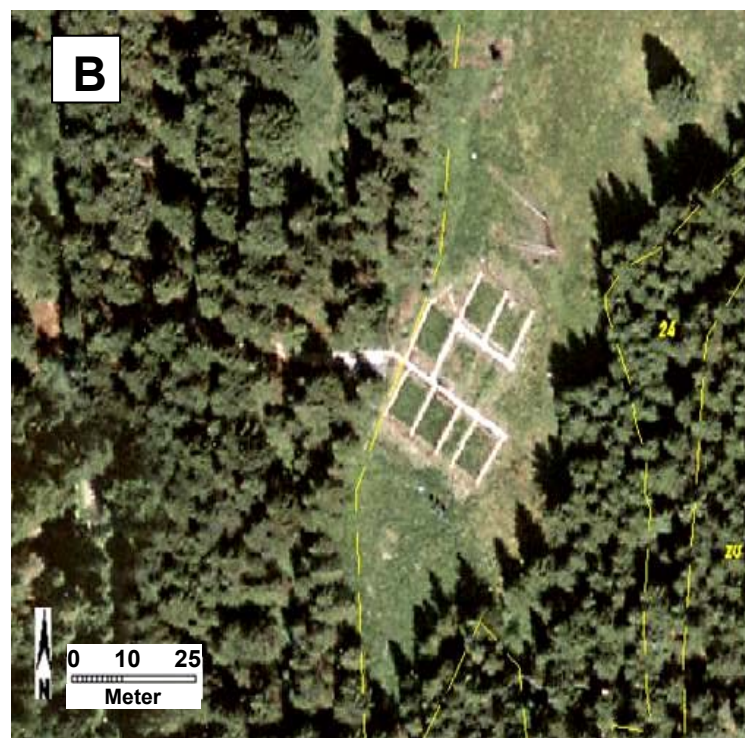
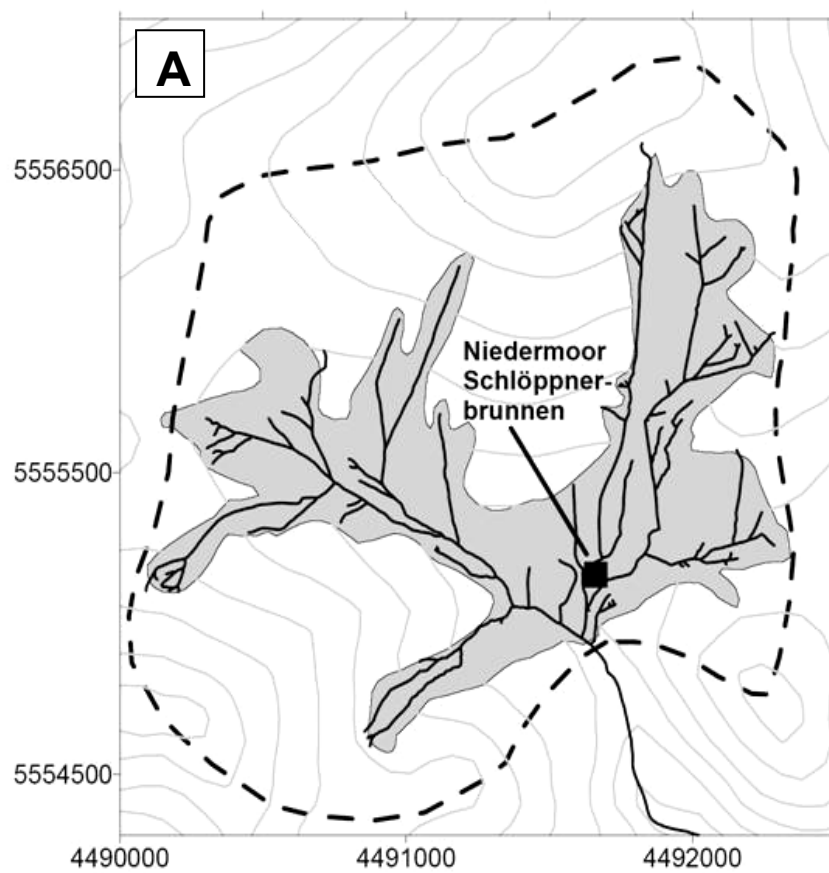
Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei auf der Identifizierung von fakultativ aeroben und obligat anaeroben Fermentierern und Methanogenen im Zusammenhang mit der Aktivität und Populationsstruktur zur Charakterisierung der Struktur-Funktionsbeziehungen im gemäßigt sauren Niedermoor.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchungsstandort Schlöppnerbrunnen

Der Untersuchungsstandort Schlöppnerbrunnen (50° 07' 53" Nord, 11° 52' 51" Ost) liegt 700 m über NN im nördlichen Teil des Fichtelgebirges (Bayern, Deutschland) im Wassereinzugsgebietes des Lehstenbachs (Abbildung 2.1 A) mit einer Fläche von 4,19 km². Es handelt sich um eine flache, nach Südosten in den Lehstenbach entwässernde Mulde, die sich zwischen dem Großen Waldstein (877 m) und dem Bergkopf (857 m) erstreckt und etwa 30 km nordöstlich von Bayreuth (Gerstberger, 2001a) liegt. Der geologische Untergrund besteht aus variszischen Graniten in unterschiedlichen Verwitterungsgraden (Lischeid et al., 2001). Die Vegetation des Einzugsgebietes wird von künstlich bestockten Fichten-Altersklassenforsten (*Picea abies* (L.) Karsten) dominiert (Gerstberger, 2001b).

Der Untersuchungsstandort Schlöppnerbrunnen ist ein Niedermoor mit einer Torfschicht von 0,3- 0,5 m Mächtigkeit. Der Boden wird als Moor- bzw. Anmoor-Gley bezeichnet. Das Niedermoor besitzt ein 3%-iges Gefälle entlang der Grundwasserfließrichtung nach Süden (Wüst, 2006). Der pH-Wert des Bodens liegt bei ca. 4,7 (Reiche et al., 2008). Im südlichen Bereich ist die Geländeoberfläche von einem Mikrorelief mit Bulten von ca. 0,5 m Höhe dominiert. Die mittlere Jahrestemperatur beträgt 5,3°C bei einem mittleren Jahresniederschlag von 1162 mm (Matzner & Huwe, 2004). Die Vegetation des Niedermoors setzt sich aus Grausegge (*Carex canescens* L.), Pfeifengras (*Molinia caerulea* (L.) Moench), Scheiden-Wollgras (*Eriophorum vaginatum* L.), Flatterbinse (*Juncus effusus* L.) und *Sphagnum* Moosen zusammen (Wüst, 2006; Paul et al., 2006). Am Rande des Niedermoors ist die Rauschbeere (*Vaccinium uliginosum* L.) zu finden, während in stark vermoorten Bereichen die Schnabel-Segge (*Carex rostrata* Stokes) wächst (Wüst, 2006; Paul et al., 2006).



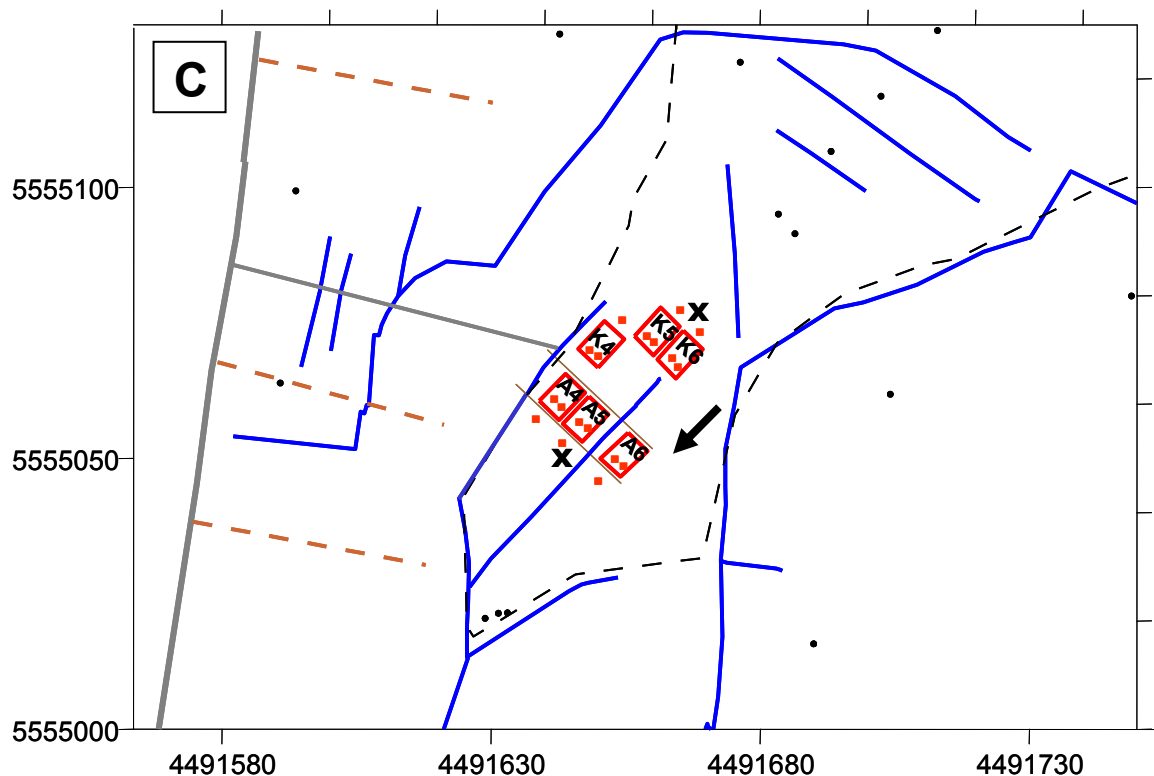


Abbildung 2.1: Lage des Untersuchungsstandortes Schlöppnerbrunnen im Wassereinzugsgebiet Lehstenbach im nördlichen Fichtelgebirge (A, verändert nach Matzner & Huwe, 2004). Grau hinterlegt: semiterrestrische Böden; Achsenabschnitte: Gauß-Krüger Koordinaten [m]. Luftaufnahme (B, mit Genehmigung der Bayerischen Vermessungsverwaltung) und Schemazeichnung (C, mit Genehmigung von G. Lischeid; verändert) der Versuchsflächen im Niedermoor Schlöppnerbrunnen. Achsenabschnitte: Gauß-Krüger Koordinaten [m]. Rote Quadrate (■) markieren die Bohrkernprobenahme und Kreuze (X) die Probenahme für Kultivierungsversuche. Die Drainagen sind durch braune Linien, die Grundwasserfließrichtung durch einen Pfeil gekennzeichnet.

2.2. Probenahme

Am Untersuchungsstandort Schlöppnerbrunnen wurden 6 Versuchsflächen (5 x 7 m) angelegt: A4, A5, A6 und K4, K5, K6 (Abbildung 2.1 B und C). Im Rahmen des Forschungsprojektes „Dynamik von Bodenprozessen bei extremen meteorologischen Randbedingungen“ (FOR 562) wurde im September 2006 (15.08.06-27.09.06) und im Frühjahr/Sommer 2007 (09.05.07-19.07.07) auf den A-Flächen ein Austrocknungseffekt durch Absenkung des Wasserstandes simuliert und anschließend das gesammelte Regenwasser wieder auf die Flächen gegeben. Die

K-Flächen dienten dabei als unbehandelte Kontrolle.

Für die kultivierungsabhängige Analyse wurden Mischproben mit Moorboden der obersten Schicht (0-10 cm) oberhalb der Kontroll- und Manipulationsflächen verwendet (Abbildung 2.1 C). Der Boden wurde mit einem Spaten aufgenommen, in Plastikbeutel luftdicht verpackt und auf Eis ohne Verzögerung in die Laborräume transportiert. Dort wurde der Boden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis (für maximal 2 h) gelagert. Für die molekularbiologische Analyse wurden jeweils 2 Bohrkerne oberhalb der Kontrollflächen bzw. unterhalb der Manipulationsflächen oder innerhalb der Flächen mit einem Wurzelbohrer (Durchmesser 10 cm) ausgestochen (Abbildung 2.1 C). Die Bohrkerne wurden in 10 cm-Segmente bis zu einer Tiefe von 40 cm unterteilt, in Plastikbeutel gasdicht verpackt und ohne Verzögerung in die Laborräume transportiert. Dort wurden die Bodenproben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren. Die Beprobung erfolgte entlang der kurzen Seiten aller Flächen innerhalb und außerhalb der abgesteckten Bereiche (Abbildung 2.1 C) zu festgelegten Terminen (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Probenahmeterminen und Verwendungszweck der Bodenproben.

Datum	Bodenprobentyp	Verwendungszweck	Manipulationsstatus
06.04.05	Mischprobe ^a	Kultivierung	n.z. ^d
04.07.05	Bohrkerne ^a	16S rRNA Analyse	n.z.
02.11.05	Mischprobe ^a	Stable isotope probing	n.z.
22.05.06	Mischproben ^a	Stable isotope probing	n.z.
14.08.06	Bohrkerne ^b	PhyloChip Analyse ^c	Vor Austrocknung
26.09.06	Bohrkerne ^b	PhyloChip Analyse ^c	Vor Wiederbefeuchtung
28.09.06	Bohrkerne ^b	PhyloChip Analyse ^c	Nach Wiederbefeuchtung
08.05.07	Bohrkerne ^b	PhyloChip Analyse ^c	Vor Austrocknung
16.07.07	Bohrkerne ^b	PhyloChip Analyse ^c	Vor Wiederbefeuchtung
25.07.07	Bohrkerne ^b	PhyloChip Analyse ^c	Nach Wiederbefeuchtung

^a Probenahme außerhalb der Versuchsflächen

^b Probenahme innerhalb der Versuchsflächen

^c Lagerung bei -80°C

^d Nicht zutreffend

Die physikalisch-chemischen Bodenparameter wurden von Pia Wüst bestimmt (Wüst, 2006; Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Physikalisch-chemische Parameter des Moorbodens. WG, Wassergehalt; T_{Fe} , Gesamteisen (total iron); T_C , Gesamtkohlenstoff (total carbon); T_N , Gesamtstickstoff (total nitrogen); C/N, Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff ($n=5$; Wüst, 2006).

Tiefe	WG	T_{Fe}	T_C	T_N	C/N	Fe(II)	NO_3^-	SO_4^{2-}
[cm]	[%]	[mg kg _{TG} ⁻¹]	[g kg _{TG} ⁻¹]				[μM]	
0-10	87,62	33,8	396,16	18,18	21,84	11,2	32,38	253,2
10-20	84,88	56,45	363,06	15,76	24,22	11,06	28,18	219,82
20-30	80,62	58,8	340,44	13,14	26,6	18,5	19,5	177,78
30-40	58,48	21,25	169,18	6,16	28,02	62,34	26,3	172,4

2.3. Analytische Methoden

2.3.1. Gasphase

Die Konzentrationen von H_2 , CO_2 und CH_4 in den Mikrokosmen und Mikroorganismenkulturen wurden durch Beprobung der Gasphase mit sterilen Spritzen und Kanülen bestimmt. Der Gasinnendruck in den Versuchsgefäßen wurde vor der Messung mit einem Nadelmanometer (DGM 2120, Horgen, Schweiz) ermittelt. Zur Messung der Gase wurden Gaschromatographen der Baureihe HP 80 series II (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, USA) mit unterschiedlichen Säulen und Detektoren verwendet (Küsel & Drake, 1995, Matthies et al., 1993, Daniel et al., 1990; Tabelle 2.3). Mittels externer Gasstandards sowie Berücksichtigung der Raumtemperatur, aktuellem Luftdruck, Innendruck, Flüssigkeitsvolumen und Gasvolumen erfolgte die quantitative Auswertung. Als externe Standards wurden mindestens fünf unterschiedliche bekannte Gaskonzentrationen in 120 ml-Serumflaschen (CS-Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland) verwendet.

Tabelle 2.3: Bedingungen und Geräte der Gaschromatographie

Bedingungen/ Geräte	Gase		
	H ₂ /O ₂ /N ₂	CH ₄	CO ₂
Detektor	Wärmeleitfähigkeits- detektor (WLD)	Flammenionisations- detektor (FID)	Wärmeleitfähigkeits- detektor (WLD)
Säule	Molecular Sieve 1/8" x 2 m (Alltech, Unterhaching, Deutschland)	Molecular Sieve 1/8" x 2 m (Alltech, Unterhaching, Deutschland)	Chromosorb 102 1/8" x 2 m (Alltech, Unterhaching, Deutschland)
Trägergas	Argon	Helium	Helium
Flussrate	33 ml min ⁻¹	30 ml min ⁻¹	15 ml min ⁻¹
Ofentemperatur	60 °C	60 °C	40 °C
Injektortemperatur	150 °C	120 °C	150 °C
Detektortemperatur	175 °C	150 °C	175 °C
Injektionsvolumen	100 µl	100 µl	100 µl
Retentionszeiten	H ₂ : 0,6 min O ₂ : 1,1 min N ₂ : 1,3 min	1,4 min	1,6 min

Die Gesamtstoffmenge eines Gases (n_{ges}) setzt sich aus der Stoffmenge in der Gasphase (n_{gas}), dem physikalisch ($n_{\text{gel,p}}$) und dem chemisch gelösten Anteil ($n_{\text{gel,c}}$) folgendermaßen zusammen:

$$n_{\text{ges}} = n_{\text{gas}} + n_{\text{gel,p}} + n_{\text{gel,c}} \text{ [}\mu\text{mol]}$$

Die Stoffmenge eines Gases in der Gasphase wurde wie folgt berechnet:

$$n_{\text{gas}} = V_{\text{Gasphase}} \cdot \frac{C}{V_{\text{akt,mol}}} \cdot \frac{P_{\text{akt}} + P_{\text{Ü}}}{P_{\text{akt}}}$$

n_{gas} : Stoffmenge in der Gasphase [μmol]; V_{Gasphase} : Volumen der Gasphase [ml]; C : gemessene Gaskonzentration [ppm]; $V_{\text{akt,mol}}$: Molvolumen des Gases unter aktuellen Bedingungen [ml]; p_{akt} : aktueller Luftdruck [mbar]; $p_{\text{Ü}}$: Überdruck im Gefäß [mbar].

$V_{\text{akt,mol}}$ lässt sich über die allgemeine Zustandsgleichung für ideale Gase berechnen:

$$V_{\text{akt,mol}} = \frac{p_1 \cdot V_1 \cdot T_{\text{akt}}}{T_1 \cdot p_{\text{akt}}}$$

p_1 : Luftdruck [mbar]; T_1 : Temperatur [K]; V_1 : Molvolumen [ml]; unter Standardbedingungen.

Der physikalisch gelöste Anteil des Gases berechnet sich demzufolge:

$$n_{\text{gel,p}} = V_{\text{flüssig}} \cdot \frac{C}{V_{\text{akt,mol}}} \cdot \alpha \cdot \frac{p_{\text{akt}} + p_{\text{Ü}}}{p_{\text{akt}}}$$

$V_{\text{flüssig}}$: Volumen der flüssigen Phase [ml]; bei der Berechnung wurde der Bunsensche Löslichkeitskoeffizient α mit einbezogen (Tabelle 2.4), da vor allem CO_2 auch in Wasser löslich ist und somit der Gasanteil in der Flüssigphase bei der Angabe der Gasmenge in dem Inkubationsgefäß berücksichtigt werden muss.

Tabelle 2.4: Bunsensche Löslichkeitskoeffizienten α verschiedener Gase in Wasser bei 15°C und 20°C.

Gas	Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient α		Referenz
	288K (15°C)	298K (25°C)	
H_2	0,018	0,017	Blachnik, 1998
CO_2	0,99	0,074	Blachnik, 1998
CH_4	0,036	0,029	Blachnik, 1998

Da CO_2 auch größtenteils bei hohen pH Werten als HCO_3^- vorliegt, muss der deprotonierte Anteil der Kohlensäure ebenfalls in die Berechnung einbezogen werden:

$$n_{\text{gel,c}} = n_{\text{gel,p}} \cdot 10^{-\text{pka}+\text{pH}}$$

2.3.2. Flüssigphase

2.3.2.1. Probenvorbereitung

Zur Bestimmung der Konzentrationen von organischen Verbindungen, Nitrat, Sulfat und Fe(II) wurden ca. 2 ml Flüssigproben in 2 ml- Eppendorfreagenzgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit sterilen Kanülen und Spritzen überführt und in einer Eppendorf 5415C Mikrozentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 14000 U min^{-1} 10 min lang sedimentiert.

2.3.2.2. Organische Säuren, Alkohole und Zucker

Zur Bestimmung der Konzentrationen von organischen Verbindungen wurde 0,3 µl des Überstands (2.3.2.1.) durch Mikrofiltration (Porendurchmesser 0,2 µm, Nylonfilter 62163, Alltech, Deerfield, IL, USA) gereinigt. Die Analyse der filtrierten Proben fand mit einem Hewlett-Packard 1090 Series II Hochdruckflüssigkeitschromatograph (HPLC) statt. Dieser war mit einem Autosampler, HP 3396 Series II Integrator und einem HP 1047A-Refraktionsindexdetektor angeschlossen (Küsel & Drake, 1995; Matthies et al., 1993; Daniel et al., 1990). Später war die HPLC mit einem UV-Detektor und einem Refraktionsindexdetektor (beide Agilent Series 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) verbunden (modifiziert nach Küsel & Drake, 1995; Matthies et al., 1993; Daniel et al., 1990). Als mobile Phase diente stets 4 mM H_3PO_4 mit einer Flussrate von $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. Das Injektionsvolumen pro Messung lag bei 20 µl.

Für die Messung von Alkoholen wurden die Proben mit einem Schambeck SFD Hochdruckflüssigkeitschromatographen (Bad Honnef, Deutschland) analysiert, der mit einem S 5200 Autosampler, einer SDS 9404 HPLC-Pumpe und einem S7131 Reagent Organizer ausgestattet war. Das PeakSimple Chromatography Interface Model 202 transferierte die Daten vom Refraktionsindexdetektor 2000 (Schambeck) auf einen PC, die dann mit der Software PeakSimple Version 2.83 (SRI Inc., Indianapolis, IN, USA) ausgewertet wurden. Als mobile Phase diente 2,5 mM H_2SO_4 mit einer Flussrate von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Das Injektionsvolumen pro Messung lag bei 50 µl. Beide Hochdruckflüssigkeitschromatographen waren mit einer Aminex Ion Exclusion Säule HPX-87H 300 x 7,8 mm (BioRad, Richmond, CA, USA) bei 60°C ausgestattet.

2.3.2.3. Nitrat

Die Nitratkonzentrationen wurden nach Velghe & Claeys (1985) bestimmt. In einem 5 ml- Reagenzglas wurden zu 0,5 ml unfiltriertem Überstand der Probe (2.3.2.1.) 25 µl 5%-iges (w/v) Resorzinol zugegeben. Nach Zugabe von 0,65 ml konzentrierter Schwefelsäure (36 N) wurde die Extinktion bei 360 nm mit einem Spectrophotometer (Pharmacia LKB Novaspec II, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Frankfurt, Deutschland) gemessen.

2.3.2.4. Fe(II)

Die Fe(II) Konzentration wurde nach der Methode Tamura et al. (1974) bestimmt. Um das gesamte Fe(II) bestimmen zu können wurde auch das in den Fe(II)/Fe(III)-Mischkristallen unlösliche Fe(II) extrahiert. Für die Extraktion wurde 0,2 ml unfiltriertem Überstand der Probe (2.3.2.1.) mit 9,8 ml HCl (0,5 N) versetzt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. 4,5 ml dieser Verdünnung wurden 0,5 ml Acetatpuffer (200 g Ammoniumacetat, 250 ml Eisessig, ad 500 ml ddH₂O) und 0,5 ml Phenanthrolin- Lösung (0,5% w/v 1,10- Phenanthroliniumchlorid- Monohydrat) zugegeben. Bei Vorhandensein von Fe(II) entwickelt sich ein roter Fe- Phenanthrolin-Komplex, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 512 nm gemessen wurde.

2.3.2.5. Sulfat

Die Sulfatkonzentrationen wurden nach Tabatabei (1992) bestimmt. Zu 1 ml unfiltriertem Überstand der Probe (2.3.2.1.) in einem Eppendorf-Reagenzgefäß wurden 100 µl HCl (0,5 N) und 100 µl Bariumgelatine-Reagenz gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Anwesenheit von Sulfat entstand eine Trübung, die bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen wurde.

Für das Bariumgelatine-Reagenz wurde 0,6 g Gelatine in 200 ml heißem ddH₂O gelöst und 16 h bei 4°C gelagert. Es wurden 8 g BaCl₂ · 2 H₂O zugegeben, nachdem die Lösung sich auf Raumtemperatur erwärmt hatte. Das Reagenz wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.4. Lösungen und Medien

Für alle Lösungen und Medien wurde bidestilliertes Wasser verwendet, das mit einer Seralpur Pro 90 CN – Anlage (Seral Erich Alhäuser, Ransbach-Baumbach, Deutschland) hergestellt wurde. Die Leitfähigkeit betrug weniger als $0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$. Alle Medien wurden bei 120°C und 1 bar Überdrucks für 25 min autoklaviert (Sanoclav, Wolf, Geislingen, Deutschland). Die Lösungen wurden entweder autoklaviert, oder sterilfiltriert (Glucose-, Xylose-, Ethanol-Stammlösung). Die Sterilfiltration erfolgte mit einem Celluloseacetat-Filter mit $0,2 \mu\text{m}$ Porengröße (Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel, Deutschland).

2.4.1. Lösungen

Anoxische Lösungen wurden modifiziert nach der Hungate-Technik (Daniel & Drake, 1993) hergestellt. Die jeweiligen Substanzen wurden nach dem Abwiegen mit einer Analysenwaage (Analytic AC 120S, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland) in einen Erlenmeyer-Kolben mit etwas ddH_2O gelöst und mit N_2 begast. Das Gemisch wurde mit kochendem ddH_2O aufgefüllt und in einem Eisbad unter N_2 Begasung auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde die Lösung in die entsprechenden Gefäße (Bellco-Röhrchen oder Serumflaschen) abgefüllt, die nach Hungate (1969) zugleich mit N_2 begast worden waren. Die Gefäße wurden mit Gummistopfen und Alukappen luftdicht verschlossen und autoklaviert. Der pH-Wert wurde jeweils vor und nach dem Autoklavieren eingestellt.

2.4.1.1. Mineralsalzlösung

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,26 g
Na_2SO_4	1,35 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1 g
KH_2PO_4	0,04 g
$\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1 g
ddH_2O	ad 1000 ml

(verändert nach Kuhner et al., 1996)

2.4.1.2. Spurenelementlösung

Nitrilotriessigsäure	1,5 g
MnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ · H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ · H ₂ O	0,01 g
AlK(SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O	0,02 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,01 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

(verändert nach Balch et al., 1979)

2.4.1.3. Vitaminlösung

Biotin	2 mg
Folsäure	2 mg
Pyridoxin-HCl	10 mg
Thiamin-HCl	5 mg
Riboflavin	5 mg
Nikotinsäure	5 mg
DL-Ca-Pantothenat	5 mg
Vitamin B ₁₂	0,1 mg
p-Aminobenzoessäure	5 mg
Liponsäure	5 mg
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Die Vitaminlösung wurde nach Balch (1979) hergestellt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

2.4.1.4. Inkubationslösung

Die anoxische Lösung für die Bodenaufschlämme der Inkubationsversuche wurde auf die chemischen Parameter des Bodenporenwassers im Niedermoor Schöppnerbrunnen nach Paul (2003) abgestimmt und wie folgt zusammengesetzt:

Mineralsalzlösung (2.4.1.1.)	10 ml
Spurenelementlösung (2.4.1.2)	10 ml
ddH ₂ O	ad 990 ml
Autoklavieren und nach Abkühlen:	
Vitaminlösung (2.4.1.3.)	10 ml

Der pH wurde mit einer sterilen NaOH (0,5 M oder 2 M) bzw. HCl (2 M oder 5 M) auf 4,8 eingestellt.

2.4.1.5. Cäsiumtrifluoracetat (CsTFA)- Gradientenlösung

CsTFA (Dichte: $2,0 \pm 0,05$ g; Amersham, Buckinghamshire, England)	4,5 ml
Formamid (BioRad, Richmond, CA, USA)	0,175 ml

Durch Zugabe von Gradient Buffer (Tris, 100 mM; KCl, 100 mM; EDTA, 1 mM) wurde die Lösung auf eine Dichte von $1,788 \pm 0,005$ g ml⁻¹ eingestellt. Hierzu wurden jeweils 0,1 ml der Lösung in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt, in einem Wasserbad auf 25°C (Standardtemperatur) erwärmt und anschließend ausgewogen.

2.4.2. Medien

Anoxische Flüssigmedien wurden modifiziert nach der Hungate-Technik (Daniel & Drake, 1993) hergestellt (2.4.1.). Zur Herstellung anoxischer Festmedien wurden die für das jeweilige Medium angegebenen Substanzen (2.4.2.1. – 2.4.2.3.) eingewogen, in der vorgegebenen Menge an ddH₂O durch Rühren mit einem Rührfisch auf einer Magnetplatte (Heidolph, MR2000, Deutschland) gelöst und nach Einstellen des pH-Werts autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium nochmals mit einem Magnetrührer vermengt und in die Anaerobenkammer

(Mecaplex, Schweiz) eingeschleust. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde das Medium in sterile Serumflaschen abgefüllt. Die Serumflaschen wurden mit sterilen Gummistopfen und Alukappen luftdicht verschlossen und liegend verfestigt. Nachdem der Agar in den Serumflaschen verfestigt war, wurden sie bis zur Verwendung bei 2°C aufbewahrt.

2.4.2.1. MH4

Das Medium MH4 wurde erstellt nach Horn (2003).

Trypton (Difco, Detroit, MI., USA)	0,5 g
Hefe Extrakt	0,5 g
Mineralsalzlösung (2.4.1.1.)	10 ml
Spurenelementlösung (2.4.1.2.)	10 ml
ddH ₂ O	ad 990 ml
Autoklavieren und nach Abkühlen:	
Vitaminlösung (2.4.1.3.)	10 ml

Zur Verfestigung wurde Agar (15 g L⁻¹) vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Für Anreicherungs- und Isolierungsversuche wurde das Medium 1:10 verdünnt (MH4v).

2.4.2.2. VL55

Das Minimalmedium VL55 wurde modifiziert nach Sait (2002) hergestellt.

Substanzen siehe Sait et al., 2002	
Mineralsalzlösung (2.4.1.1.)	10 ml
Spurenelementlösung (2.4.1.2.)	10 ml
ddH ₂ O	ad 990 ml
Autoklavieren und nach Abkühlen:	
Vitaminlösung (2.4.1.3.)	10 ml

2.4.2.3. Substratzugabe

Neben der Inkubation auf den Medien MH4, MH4v und VL55 wurden zusätzlich jeweils verschiedene Substrate als Kohlenstoffquelle zugegeben:

Buttersäure (Butyrat)	1 mM
Stärke	2%
Cellobiose	1 mM
Gelatine	2%
Xylan	2%
Mannitol	2%
Cellulose	2%
Pektin bzw.	2%
Pektin Agarplatten	0,5%

2.4.2.4. SOC- Medium

Trypton (Difco, Detroit, MI., USA)	2 g
Hefe Extrakt	0,5 g
NaCl (1M)	1 ml
KCl (1M)	0,25 ml
ddH ₂ O	ad 97 ml
Autoklavieren	
Nach Abkühlen zugeben:	
Mg ²⁺ -Stammlösung (2 M)	1 ml
Glucose-Stammlösung (2 M)	1 ml
ph 7 einstellen	
ddH ₂ O	ad 100 ml

Sterilfiltration erfolgte mit der Mg²⁺- (MgCl₂, 20,33 g; MgSO₄, 24,65 g; ad 100 ml) und der Glucose-Stammlösung. Das SOC-Medium wurde sterilfiltriert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.4.2.5. LB-Platten mit Ampicillin/IPTG/X-Gal

Trypton (Difco, Detroit, MI., USA)	10 g
Hefe Extrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
ddH ₂ O	1000 ml

pH 7 einstellen

Autoklavieren

Nach Abkühlen auf ca. 50°C zugeben:

Ampicillin-Stammlösung (100 mg ml ⁻¹)	1 ml
---	------

IPTG-Stammlösung (0,5 M)	1 ml
--------------------------	------

X-Gal-Stammlösung (50 mg ml ⁻¹)	1,6 ml
---	--------

Ampicillin Stammlösung

Ampicillin	100 mg
------------	--------

ddH ₂ O	ad 1 ml
--------------------	---------

IPTG-Stammlösung

Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG; Promega, Madison, WI., USA)	6 g
---	-----

ddH ₂ O	ad 50 ml
--------------------	----------

X-Gal-Stammlösung

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid	50 mg ml ⁻¹
---	------------------------

(in N,N'-Dimethylformamid; Promega, Madison, WI., USA)

ddH ₂ O	ad 1 ml
--------------------	---------

Alle Stammlösungen wurden sterilfiltriert. Das Medium wurde in einer Sterilbank in sterile Plastikpetrischalen gegossen und nach Verfestigung bei 4°C aufbewahrt.

2.5. Wachstumsmessungen

Das Wachstum einer Flüssigkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei 660 nm (Milton Roy Spectronic 501, Bausch & Lomb Inc., Rochester, NY, USA) bestimmt. Positiv für Wachstum war eine OD > 0,1. Bei Medien, die eine photometrische Messung nicht zuließen, wurden CO₂ Konzentrationen durch Messung am Gaschromatographen (2.3.1) bestimmt.

2.6. Stammkulturen

Stammkulturen zur Evaluierung der Microarray-Sonden waren bereits am Lehrstuhl Ökologische Mikrobiologie der Universität Bayreuth vorhanden, oder wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) erworben (Tabelle 2.5). Das Archaeenzentrum der Universität Regensburg stellte genomische DNA und gefriergetrocknete Zellen bestimmter thermophiler Archaeen zur Verfügung (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Verwendete Stammkulturen, deren Inkubationsbedingungen, Medien und Herkunft.

Stammkultur	Inkubations- bedingungen	Medium	Herkunft	Referenz
<i>Methanothermobacter defluvii</i>	60°C, H ₂ /CO ₂ (80:20 %, 1 bar Überdruck)	MH4, pH 7	DSMZ (Nr. 7466)	Kotelnikova et al., 1993
<i>Methanospirillum hungatei</i>	37°C, H ₂ /CO ₂ (80:20 %, 1 bar Überdruck)	MH4, pH 7	DSMZ (Nr. 864)	Ferry et al., 1974
<i>Methanoplanus limicola</i>	30°C, H ₂ /CO ₂ (80:20 %, 1 bar Überdruck)	MH4, pH 7	DSMZ (Nr. 2279)	Wildgruber et al., 1982
<i>Methanosarcina semesiae</i>	30°C; N ₂ /CO ₂ (80:20 %)	MH4, pH 7	DSMZ (Nr. 12914)	Lyimo et al., 2000
<i>Methanosaeta concilii</i>	35°C	MH4, pH 7	Universität Bayreuth	Patel, 1984
<i>Methanothermus fervidus</i> ^a	n.z. ^c	n.z.	Universität Regensburg	Stetter et al., 1981
<i>Methanopyrus kandleri</i> ^b	n.z.	n.z.	Universität Regensburg	Kurr et al., 1992
<i>Archaeoglobus profundus</i> ^a	n.z.	n.z.	Universität Regensburg	Burggraf et al., 1990

^a genomische DNA in EtOH

^b gefriergetrocknete Zellen

^c nicht zutreffend

2.7. Kultivierung fakultativer Aerobier und obligater Anaerobier

2.7.1. Verdünnungsreihen

Für die Anreicherung von fakultativen Aerobiern und obligaten Anaerobiern wurden serielle oxische und anoxische Verdünnungsreihen aus der Inkubationslösung (2.4.1.4.) erstellt. Für die oxische 10^{-1} Verdünnung wurden 5 g Boden in eine Müller-Krempel-Flasche eingewogen, mit 500 ml der sterilen Inkubationslösung unter Umgebungsluft vermengt und die Flasche luftdicht verschlossen. Für die anoxische 10^{-1} Verdünnung wurde Boden in die Anaerobenkammer (Mecaplex, Schweiz) eingeschleust, dort eingewogen (5 g), mit 500 ml anoxischer Inkubationslösung vermengt und unter N_2 -Atmosphäre luftdicht verschlossen. Die Bodenaufschlämmungen wurden in einem Überkopfschüttler über Nacht bei 15°C homogenisiert. Aus der jeweiligen niedrigeren Verdünnung wurden 3 ml mit einer sterilen Kanüle und Spritze entnommen und in eine Serumflasche mit 27 ml steriler Inkubationslösung bis zur Verdünnung von 10^{-10} transferiert. Als Kontrolle diente die sterile oxische bzw. anoxische Inkubationslösung.

Um fakultative Aerobier und obligate Anaerobier bei unterschiedlichen Bedingungen anzureichern, wurde aus jeder oxischen bzw. anoxischen Verdünnungsstufe die entsprechende Verdünnungsstufe aller flüssigen und festen Nährmedien (2.4.2.1. und 2.4.2.2.) mit den jeweiligen Substraten (2.4.2.3.) inokuliert. Die beimpften Medien wurden bei 15°C inkubiert.

Es erfolgte eine DNA Extraktion der 2 höchsten bewachsenen Verdünnungsstufen der anoxischen Flüssigmedien (2.4.2.1.-2.4.2.3.). Die extrahierte DNA wurde mit für Bakterien-16S rRNA Gen-spezifischen Primern (Tabelle 2.6) amplifiziert und damit anschließend eine DGGE durchgeführt (2.9.8.2.). Es wurden Genbibliotheken von 16S rRNA mit einem unterschiedlichen DGGE-Profil erstellt und repräsentative Klone sequenziert (2.9.9.).

2.7.2. Medientransfer

Für die Überimpfung von oxisch angewachsenen Kolonien auf neue Agarplatten wurde eine Impföse abgeflammt, etwas Zellmaterial einer Einzelkolonie

aufgenommen und ein Verdünnungsausstrich auf einer neuen sterilen Agarplatte durchgeführt. Der Transfer von anoxisch gewachsenen Kolonien wurde in der Anaerobenkammer (Mecaplex, Schweiz) durchgeführt. Dazu wurden die luftdicht verschlossenen Serumflaschen geöffnet, eine Einzelkolonie mit einer ausgeglühten Impföse gepickt und in sterile Serumflaschen überführt, die wiederum luftdicht verschlossen wurden. Für den Transfer von Einzelkolonien in flüssiges Medium wurden diese mit einer sterilen Kanüle und Spritze aufgenommen und die Spritze mit flüssigem Medium gespült.

Jeweils 1 ml von aeroben oder anaeroben Flüssigkulturen wurde mit einer sterilen Kanüle und Spritze aufgenommen und in steriles Flüssigmedium überführt. Für den Transfer von Flüssigkulturen auf Festmedium wurden ca. 100 µl der Kultur mit einem sterilen Trigalski-Spatel ausplattiert.

2.7.3. Isolierung

Morphologisch unterschiedliche Einzelkolonien der oxischen Verdünnungsreihen wurden zuerst auf oxische Agarplatten mit dem jeweiligen Medium ausgestrichen. Nach erneutem Wachstum, wurden Einzelkolonien in anoxisches Flüssigmedium überführt. Mehrere Male erfolgte ein Transfer der Mikroorganismen von anoxischen Flüssigmedien auf oxische Festmedien und umgekehrt. Die Identifikation der 16S rRNA Gensequenz der Isolate erfolgte durch PCR, wobei eine Zellsuspension oder Einzelkolonie als Matrize eingesetzt wurde (2.9.6.2.). 16S rRNA Gene der Isolate mit unterschiedlicher Kolonie-Morphologie und unterschiedlichem RFLP-Muster (2.9.8.4.) wurden zur Sequenzierung (2.9.10.) verschickt.

Flüssigkulturen der oxischen Verdünnungsreihe wurden auf oxischen Festmedien ausplattiert und nach Wachstum wurden die Einzelkolonien behandelt wie oben beschrieben. Einzelkolonien mit unterschiedlichen Morphologien, die aus anoxischen Festmedien stammten, wurden 2-mal auf anoxisches Festmedium überführt. Die Identifikation erfolgte wie oben beschrieben.

Die Reinheit der Isolate wurde mittels Mikroskopie (Zeiss Axioskop 2, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) und DGGE (2.8.8.2.) untersucht.

2.8. Inkubation mit stabilen Isotopen

Um den Effekt von Monomeren auf die mikrobiellen Abbauprozesse im sauren Niedermoor zu untersuchen und daran beteiligte Mikroorganismen zu identifizieren, wurden anoxische Bodenaufschlammungen mit ^{13}C -Substrat (Ethanol, Xylose und Glucose) inkubiert. ^{13}C wird in die RNA derjenigen Mikroorganismen inkorporiert, die das Substrat abbauen können. Nach Trennung der ^{12}C - von ^{13}C -RNA durch Dichtegradienten- Zentrifugation (2.9.3.), kann die ^{13}C - markierte 16S rRNA der substratverwertenden Mikroorganismen mit molekularbiologischen Methoden (2.9.) identifiziert werden (16S rRNA stable isotope probing, SIP; Dumont & Murrell, 2005).

2.8.1. Vorinkubationen

Zur Begünstigung der Fermentation und Methanogenese im Moorboden wurde der Boden zunächst ohne Substrat inkubiert, wobei die Menge der Elektronenakzeptoren (außer CO_2) herabgesetzt werden sollte. 690 ml der sterilen, anoxischen Mineralsalzlösung wurden zu 275 g_{FG} Moorboden in einer luftdicht verschlossenen Müller-Krempel-Flasche (1.1 L) hinzugefügt und die Gasphase wurde auf 100% N_2 justiert. Täglich wurden Nitrat-, Sulfat-, und Fe^{2+} -Konzentrationen bestimmt (2.3.2.3.-2.3.2.5.). Die Vorinkubation wurde in einem Überkopfschüttler für 8 Tage im Dunkeln durchgeführt, bis Nitrat- und Sulfatkonzentrationen verbraucht waren und Fe^{2+} -Konzentrationen ein Plateau erreichten.

2.8.2. Bodeninkubationen mit ^{12}C - und ^{13}C - Substraten

Die vorinkubierte Bodenaufschlammung wurde auf 11 gasdichte Müller-Krempel-Flaschen (Endvolumen 350 ml) in einer Anaerobenkammer (Mecaplex, Schweiz) unter N_2 -Atmosphäre aufgeteilt. ^{12}C - bzw. ^{13}C -Xylose, Glucose, Ethanol wurden von sterilen, anoxischen Stammlösungen auf ca. 0,4 mM eingestellt. Substrat wurde erneut auf ca. 0,4 mM eingestellt, wenn die Konzentration unter 0,2 mM lag. Kontrollen waren anoxische Bodenaufschlammungen ohne Substrat. Für Kontrollen und Bodenaufschlammungen mit ^{12}C -Substrat wurden 3 Replikate durchgeführt. Alle

Mikrokosmen wurden bei 15°C im Dunkeln inkubiert. Gase (H₂, CO₂, CH₄), Zucker, Alkohole und organische Säuren wurden analysiert (2.3.1. und 2.3.2.).

2.9. Molekularbiologische Methoden

Zur Identifikation der Bakterien- und Archaeen-Gemeinschaft im Niedermoor wurde der Boden molekularbiologisch untersucht. Dazu wurde DNA und RNA aus dem Boden extrahiert und die *Bacteria*- und *Archaea*- 16S rRNA Gene analysiert.

2.9.1. Extraktion von RNA und DNA

Beim Umgang mit RNA wurde darauf geachtet, dass verwendeten Lösungen und Glasgefäße frei von aktiven RNasen waren. Glasgefäße wurden hierzu für 7 h bei 180°C sterilisiert. Die Herstellung von RNase-freiem Wasser erfolgte durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC), das RNasen inaktiviert (Lottspeich et al., 2006). Es wurden 999 ml ddH₂O mit 1 ml DEPC versetzt und die Lösung 4 h bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde zur Inaktivierung des DEPC autoklaviert. Dieses DEPC-Wasser wurde für alle Lösungen und Puffer verwendet, die zur Analyse von RNA benötigt wurden. Zusätzlich wurden nur Plastikgefäße und Pipettenspitzen verwendet, die als DNase- und RNase-frei ausgezeichnet waren.

Die RNA und DNA Koextraktion erfolgte aus 0,5 g Boden nach Griffiths (2000) und dem Qiagen RNA/DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Nach einer mechanischen Lyse der Zellen durch Bead Beating wurden die Nukleinsäuren durch Extraktion mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol von fettlöslichen Proteinen gereinigt und anschließend ausgefällt.

DNA wurde aus 1 g Boden mit dem Power Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA., USA) nach Protokoll des Herstellers extrahiert. DNA aus Zellmaterial wurde mit dem Bilatest Bac Kit (Bilatec AG, Viernheim, Deutschland) extrahiert.

2.9.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde eine mit DEPC-Wasser (RNase-frei) verdünnte Probe in einer sterilen Küvette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegen den Blindwert Wasser bei 260 nm photometrisch mit Hilfe eines UVIKON 930 Spektrophotometers (Kontron Instruments, Schlieren, Deutschland) gemessen. Bei dieser Wellenlänge besitzen Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht bei einer RNA- Konzentration $33 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Lottspeich et. al., 2006). Alternativ wurden die RNA oder DNA-Konzentrationen der Proben mit einem Nanodrop-Spektrophotometer (Peglab, Erlangen, Deutschland) vermessen.

2.9.3. Dichtegradienten- Zentrifugation

Die Trennung der ^{13}C -angereicherten „schweren“ RNA von der „leichten“ ^{12}C RNA erfolgte mit Hilfe der Dichtegradienten- Zentrifugation, die an der Universität Warwick (England) durchgeführt wurde. Nach Meselson (1958) bewirkt die Assimilation eines schweren ^{13}C -Isotops eine Erhöhung der Dichte der Nukleinsäuren von Organismen, die dieses Isotop (z. B. in Form von Glucose) assimilieren. Somit können diese in einem Dichtegradienten von der DNA/RNA der restlichen mikrobiellen Gemeinschaft getrennt werden. Es wurden deshalb ca. 500 ng RNA (Manefield et al., 2002) zunächst mit 1 ml CsTFA-Gradientenlösung gemischt. Diese Lösung wurde anschließend mit Hilfe einer sterilen Einmalspritze ohne Stempel, die als Trichter fungierte, in Beckman Quick-Seal Zentrifugenröhrchen transferiert (13 x 51 mm, Beckman Instruments, Palo Alto, USA). Bei der Zentrifugation wurde außerdem eine Kontrolle ohne RNA mitgeführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden bis zum unteren Rand des Tube-Halses mit Gradientenlösung aufgefüllt und mit einem Gewichtsunterschied von max. 0,05 g austariert. Nachdem die Tubes verschweißt wurden und ihr Gewicht erneut überprüft worden war, wurden sie in einen Beckman Vertikalrotor (VTi 65.2, Beckman Coulter, Fullerton, USA) gestellt. Die Zentrifugation erfolgte in einer Beckman L8-70M Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, USA) unter Vakuum für 62 h bei $37\,800 \text{ U min}^{-1}$ ($\sim 130\,000 \times g$) und 20°C . Um eine Vermischung des Gradienten zu

vermeiden, wurde der Rotor nach der Zentrifugation nicht abgebremst, sondern lief bis zu seinem Stillstand aus.

2.9.4. Fraktionierung von ^{12}C - und ^{13}C - RNA

Nach der Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die Zentrifugenröhrchen vorsichtig aus dem Rotor genommen und senkrecht in ein Stativ eingespannt. Zur Fraktionierung der Gradienten (Manefield et al., 2002) wurde eine Peristaltik-Pumpe (BioRad, Hercules, USA) verwendet. Zuerst wurden die Zentrifugenröhrchen mit 70% Ethanol gereinigt. Auf das eine Schlauchende der Pumpe wurde eine abgeschnittene Einmalspritze mit einer sterilen Kanüle (0,6 mm Durchmesser) gesetzt, und seitlich unterhalb des Röhrchen-Halses mit der Kanülenöffnung nach oben eingestochen wurde. Das andere Schlauchende befand sich im sterilen DEPC-Wasser, das mit Bromphenolblau gefärbt worden war. Eine zweite Kanüle (0,8 mm Durchmesser) wurde in der Mitte des Zentrifugenröhrchenbodens bis etwa zur Hälfte der Kanüle eingestochen und wieder herausgenommen. Bei einer Flussgeschwindigkeit von $400 \mu\text{l min}^{-1}$ wurde das gefärbte Wasser auf die RNA-Gradientenlösung gepumpt, die somit durch die Öffnung am Boden des Tubes herausgedrückt wurde. Im 1-min-Takt wurden dreizehn Fraktionen in vorbereiteten Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gesammelt, die sich unterhalb der Zentrifugenröhrchenöffnung befanden. Die dreizehnte Fraktion enthielt bereits gefärbtes DEPC-Wasser. Um die Dichte der einzelnen Fraktionen zu bestimmen, wurden jeweils 100 μl der verschiedenen Fraktionen einer mitgeführten Kontrolle ohne RNA auf 25°C (Standardtemperatur) erwärmt und ausgewogen.

2.9.5. Präzipitierung der RNA aus den Fraktionen

Die fraktionierte RNA wurde durch gleiches Volumen an Isopropanol gefällt und für 15 min bei 4°C zentrifugiert ($13\,000 \times g$). Das RNA-Pellet wurde mit 70%-igen, eiskalten Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 20 μl DEPC-Wasser gelöst.

2.9.6. Vervielfältigung und Analyse von Nukleinsäuren

2.9.6.1. Reverse Transkription der RNA

Die Synthese von cDNA aus der gefällten RNA wurde mit Hilfe des Enzyms SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt, das die RNA in ebenfalls einzelsträngige, komplementäre cDNA transkribiert. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll „SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR – First-Strand Synthesis Using Random Primers“. Zur Synthese einzelsträngiger cDNA aus der präzipitierten RNA wurden Hexamere verwendet und anschließend die unspezifische cDNA mit Bakterien- oder Archaeen-spezifischen Primern (Tabelle 2.6) amplifiziert.

2.9.6.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) konnten spezifische DNA-Fragmente (Zielsequenz, target) amplifiziert werden (Saiki et al., 1988). In 3 verschiedenen Zyklen, die sich in einer bestimmten Anzahl wiederholten, wurde die Zielsequenz jeweils dupliziert. Die drei Zyklen bestehen aus der Denaturierung der Matrizen-DNA (template), das Anbinden (Annealing) der Primer und der Elongation durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Zur Amplifizierung der gewünschten Zielsequenz wurden jeweils ein Forward- (F-) und Reverse- (R-) Primer verwendet. Die Primer für die DGGE verfügten zusätzlich über eine GC-Klammer am 5'-Ende. Die verwendeten Primer (Tabelle 2.6) wurden bei MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) hergestellt und erworben.

Tabelle 2.6: Verwendete Primer, deren Zielgruppe, 16S rRNA Position, Sequenz und Schmelztemperatur.

Primer	Ziel- gruppe	16S rRNA Position ^a	Sequenz (5'-3')	T _m ^b [°C]	Referenz
ARC344Fa- Clamp ^c	<i>Archaea</i>	330-344	ACG GGG YGC AGC AG ^d	50	Horn et al., 2003
ARC4Fa ^f	<i>Archaea</i>	4-21	TCC GGT TGA TCC YGS CRG ^d	53/5 7	Horn et al., 2003

27F ^g	<i>Bacteria</i>	8-25	AGA GTT TGA TCM TGG CTC ^d	52,6	Lane, 1991
M13F	Vektor	n.a. ^e	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	53,7	Messing et al., 1983
GM5-clamp ^c	<i>Bacteria</i>	341-357	CCT ACG GGA GGC AGC AG	58	Muyzer et al., 1998
ARC915R ^g	<i>Archaea</i>	933-915	GTG CTC CCC CGT AGG AGT	60	Horn et al., 2003
1492R	<i>Bacteria</i>	1504- 1492	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	52	Lane, 1991
M13R	Vektor	n.a.	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	53,7	Messing et al., 1983
907RM	<i>Bacteria</i>	926-907	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT ^d	54/5 6	Lane, 1991

^a Nummerierung nach Brosius (1981)

^b Schmelzpunkt berechnet nach $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T) ^\circ C$

^c mit GC-Klammer (CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G) am 5'- Ende

^d Y= C oder T; M = A oder C

^e n.a. = nicht anwendbar

^f auch verwendet mit T7-Promotor-Anhang

^g auch verwendet mit Fluoreszenzfarbstoff IRD700 Markierung für T-RFLP

Die verwendeten Reagenzien wurden jeweils auf Eis aufgetaut (Tabelle 2.7). Die Volumenanteile wurden mit der Anzahl der Proben multipliziert und zusammenpipettiert (Mastermix; Tabelle 2.7). Mit jedem Ansatz wurde eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, die aus dem Mastermix ohne DNA-template bestand. Die PCR wurde in einem Thermogradientencycler Biometra T-Gradient (Biometra, Göttingen, Deutschland) oder in einem Thermocycler PeqLab Primus 96 (Peqlab, Erlangen, Germany) durchgeführt, die die jeweiligen Programmen beinhaltet (Tabelle 2.8). Alle Arbeitsschritte wurden mit sterilen Pipettenspitzen und Gefäßen vollzogen.

Tabelle 2.7: Volumina der PCR-Reagenzien pro 50 µl-Ansatz.

Reagenzien	Pro Ansatz ^a [µl]	Pro Ansatz ^b [µl]	Pro Ansatz ^c [µl]
PCR Mix	n.z. ^d	10	10
PCR-ddH ₂ O	18,8	14	8
10 x PCR Puffer	5	n.z.	n.z.
PCR Nukleotid-Mix	5	n.z.	n.z.
Forward-Primer	2	1	1
Reverse-Primer	2	1	1
BSA	6	n.z.	1
Enhancer	10	n.z.	5
DNA-Template	1	1	1
Taq-Polymerase [5 U µl ⁻¹]	0,2	n.z.	n.z.

^aohne PCR-Master Mix (Eppendorf)^bmit PCR- Master Mix (Eppendorf)^cVerwendet für Boden-DNA^d nicht zutreffend**Tabelle 2.8:** Für PCR verwendete Programme

Nr.	Schritt	Zeit [min]	Primersets				
			M13uni/ M13rev	27F/ 907R	ARC4Fa / 915R	GM5 ^a / 907R	ARC344Fa ^a /915R
			Temperatur [°C]				
1	Anfangsdenaturierung	5	94	94	94	94	94
2	Denaturierung	1	n.z. ^b	94	n.z.	n.z.	n.z.
3	Annealing	1	n.z.	40	n.z.	n.z.	n.z.
4	Elongation	1.3	n.z.	72	n.z.	n.z.	n.z.
5	Zyklus (Schritt 2-4)		n.z.	4x	n.z.	n.z.	n.z.
6	Denaturierung	1	94	94	94	94	94
7	Annealing	1	52	50	55	56	55
8	Elongation	1.3	72	72	72	72	72
9	Zyklus: Schritt 6-8		32x	30x	33x	31x	33x
10	Endelongation	5	72	72	72	72	72
11	Ende	∞	10	10	10	10	10

^a mit GC-Klammer (CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G) am 5'-Ende^b nicht zutreffend

2.9.7. Aufreinigung von PCR-Produkten

Bei einer größeren Probenanzahl wurden PCR-Produkte mit Millipore PCR₉₆ Cleanup Plates (Millipore Corporation, Bedford, USA) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Bei einer geringeren Probenanzahl wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers verwendet.

2.9.8. Gelelektrophorese Systeme

2.9.8.1. Agarose Gelelektrophorese

Die Qualität und Quantität von DNA-Extrakten und PCR-Produkten wurden mittels der horizontalen Agarose Gelelektrophorese mit Agarose-Konzentrationen von 1-3% (w/v) überprüft (Sambrook et al., 1989). Die Gele wurden mit Agarose (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 1 x Tris-Acetate-EDTA (TAE)-Puffer (BioRad, Richmond, CA., USA; Tabelle 2.9) hergestellt, dabei diente der 1 x TAE-Puffer auch als Laufpuffer. Nach dem Aufkochen der Agarose-Lösung wurde zur Visualisierung nach kurzem Abkühlen Ethidium-Bromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridinium-bromid, Endkonzentration von 0,08 mg ml⁻¹; BioRad) in das flüssige Gel gegeben. Die Gele wurden in einem Gelgießstand gegossen und nach Verfestigung in die Elektrophorese-Kammer (Techne, Jahnsdorf, Deutschland) überführt. 3 µl der Probe wurden mit 1 µl 6x Ladepuffer (Bromphenolblau, 0,05%; Xylencyanol, 0,05%; Glycerin, 55%) in einer Mikrotiterplatte vermischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. In die äußersten Geltaschen wurden 2 µl des Längenstandards MWM1 oder MWM2 (Biatec, Mannheim, Deutschland) pipettiert.

Es wurde eine Spannung von ca. 8 V cm⁻¹ angelegt, um die DNA-Fragmente aufzutrennen (Power-Pak 3000, Bio-Rad, Richmond, CA., USA). Die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht auf einem UV-Flächenstrahler (UVT-20M, Herolab GmbH, Wiesloch, Deutschland) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit der Digital-Kamera Canon PowerShot G5 (Canon, Krefeld, Deutschland) und der dazugehörigen Software (Remote Capture). Die Länge der DNA-Fragmente wurde relativ zum Standard abgeschätzt und anhand einer Regressionsanalyse quantifiziert.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung des 50 x TAE-Puffers (BioRad, Richmond, CA., USA)

Bestandteil	Menge	Endkonzentration
Tris-HCl	242 g	2 M
Eisessig	57,1 ml	1 M
0,5 M EDTA, pH 0,8	100 ml	50 mM
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

2.9.8.2. Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Ähnlich lange DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Sequenz wurden anhand ihres Schmelzverhaltens in einem denaturierenden Gradienten-Gel aufgetrennt (Muyzer et al., 1998). Durch die GC-Klammer am 5'-Ende jedes DNA-Fragments besaß das PCR-Produkt eine „high melting domain“ mit hohem Schmelzpunkt sowie durch die restliche Sequenz eine „low melting domain“ mit niedrigem Schmelzpunkt. Zur Denaturierung im Acrylamidgel wurde ein Gemisch aus Harnstoff (U) und Formamid (F) eingesetzt. Der UF-Gradient simuliert die Temperatur-Erhöhung im Gel und betrug entweder 35-70% oder 40-60% UF. Die DGGE erfolgte mit dem Ingenyphor U2 System (Ingeny, Goes, Niederlande), das mit einer Spannungsquelle (Power-Pak 3000, Bio-Rad, Richmond, CA., USA) verbunden war. Die Acrylamid-Lösungen waren wie folgt zusammengesetzt und wurden zur Erstellung von Gradienten in bestimmten Volumenanteilen vermengt (Tabelle 2.10).

0% Denaturierendes Acrylamid (0% UF, 6% AA)

Acrylamid/Bisacrylamid (40%, BioRad, Richmond, CA., USA)	15 ml
50 x TAE (Tabelle 2.9)	2 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml

80% Denaturierendes Acrylamid (80% UF, 6% AA)

Acrylamid/Bisacrylamid (40%, BioRad, Richmond, CA., USA)	15 ml
50 x TAE (Tabelle 2.9)	2 ml
Formamid (deionisiert, F)	32 ml
Harnstoff (Urea, U; Roche, Penzberg, Germany)	33,6 g
ddH ₂ O	ad 100 ml

Tabelle 2.10: Zusammensetzung der Lösungen für unterschiedliche DGGE- Gradienten.

UF-Gehalt [%]	35	40	60	70
0% UF, 6% AA [ml]	13,5	12	6	3
80% UF, 6% AA [ml]	10,5	12	18	21
TEMED [μ l]	5	5	5	5

Die Glasplatten und Spacer wurden gründlich mit ddH₂O und Ethanol gereinigt zu einem „Gel-Sandwich“ zusammengebaut. Der 1 x TAE-Puffer wurde in den Elektrophorese-Tank gefüllt und auf 60°C vorgeheizt. Kurz vor Gießen des Gels wurden 5 μ l N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED; BioRad, Richmond, CA., USA) und 100 μ l Ammoniumpersulfat (APS, 10%) zugesetzt, um den Polymerisierungsvorgang zu starten. Das Gel wurde nach Angaben des Herstellers mit einem Gradienten-Mischer gegossen, mit dem ein graduelles Mischungsverhältnis von unterschiedlich konzentrierten UF-Acrylamid-Lösungen erzeugt wurde. Über das Gradientengel wurde ein Sammelgel aus 10 ml 0% UF, 6% AA, 10 μ l TEMED und 200 μ l APS gegossen. Nach Polymerisierung des Gels wurde das gesamte Gel-Sandwich in den Elektrophoresetank eingesetzt. 12 bis 20 μ l der Proben wurden mit 2 μ l an 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Banden erfolgte für 18 Stunden bei einer Spannung von 100 V.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min in einer mit ddH₂O gefüllten Wanne gewaschen und für 30 min in 500 ml ddH₂O mit 40 μ l 10.000 x SYBR-Green-Lösung (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) gefärbt. Nicht gebundener Farbstoff wurde anschließend durch ein 5-minütiges Bad in ddH₂O entfernt. Das Gel wurde mit einem Fluoreszenz-Imager (Storm 860, Amersham Biosciences, Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) im Modus „Blue Fluorescence“ gescannt und mit Hilfe der Software ImageQuant 5.0 (Amersham Biosciences) dokumentiert und ausgewertet.

2.9.8.3. Terminale-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP)-Analyse

Die T-RFLP-Analyse wurde nach Liu (1997) durchgeführt. Dabei wurden die mit dem Farbstoff IRD700 markierten PCR-Produkte (2.9.6.2.), mit Restriktionsenzymen (Tabelle 2.12) geschnitten. Diese Endonukleasen spalten doppelsträngige DNA-Moleküle durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen an palindromischen Sequenzen aus vier Nukleotiden. Die Lage der Spaltstellen ergibt je nach Sequenz der DNA, Restriktionsfragmente verschiedener Länge und somit unterschiedliche Bandenmuster bei der Analyse durch Gelelektrophorese.

Für die T-RFLP-Analyse wurden die PCR-Produkte mit dem Enzym *Mung Bean Nuclease* (MBN: 10 U μl^{-1} , England BioLabs, Ipswich, USA; Tabelle 2.12) von einzelsträngigen Überhängen befreit, um somit eine mögliche Entstehung von Pseudo-T-RFs zu verhindern (Egert et al., 2003). Um die Reaktion zu stoppen, wurde das verdaut PCR-Produkt aufgereinigt (2.9.7.). Anschließend wurden die aufgereinigten Bakterien-16S rRNA Gene mit *MspI* (Promega, Madison, USA) oder *HaeIII* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verdaut (Tabelle 2.12). Die aufgereinigten 16S rRNA- Gene der *Archaea* wurden mit dem Enzym *TaqI* (New England BioLabs, Ipswich, USA) geschnitten (Tabelle 2.12). Zu ca. 100 ng IRD 700-markiertem, aufgereinigtem PCR-Produkt wurden 2 μl 10 x Reaktionspuffer, 0,2 μl BSA (10 mg ml^{-1}) und 0,5 μl Restriktionsenzym (*MspI*: 10 U μl^{-1} , *HaeIII*: 10 U μl^{-1} , *TaqI*: 20 U μl^{-1}) gegeben und der Reaktionsansatz mit PCR- H_2O auf 20 μl aufgefüllt. Die Reaktionspuffer und BSA wurden jeweils mit dem Enzym mitgeliefert.

Die markierten Fragmente (T-RFs) mit unterschiedlicher Länge wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die unterschiedlichen T-RFs repräsentieren verschiedene Gensequenzen und dienen somit als Erkennungsprofil („Fingerprints“) der mikrobiellen Gemeinschaft. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem Licor NEN 4300 (Licor, Lincoln, USA). Die Apparatur bestand aus zwei sorgfältig mit ddH_2O , 70% Ethanol und 80% Isopropanol gereinigten Glasplatten. Auf der Innenseite in der Kammregion der vorderen, kürzeren Glasplatte waren 200 μl einer 1:1 Lösung aus 10%-iger Essigsäure und Bind-Silane (plusone, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) pipettiert und mit Hilfe eines fusselfreien Tuches verteilt worden. Nach 15-minütigem Trocknen der „Binding Silane“ wurde die Gelgießvorrichtung nach Angaben des Herstellers zusammengebaut. Die

Acrylamidlösung setzte sich aus 15 g Harnstoff, 3,75 ml 40% Acrylamide/Bis Solution (37,5:1; 2,6% C; Bio-Rad, Hercules, USA), 12 ml 2,5 x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland; Tabelle 2.11) und 3,25 ml ddH₂O zusammen. Die Substanzen wurden auf einem Magnetrührer gelöst. Durch Zugabe von 175 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat und 17 µl N,N,N,N,-Tetramethylethyldiamin (Ultra Pure Temed, Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde die Polymerisierungsreaktion gestartet.

Nach Filtration der Acrylamidlösung (Porendurchmesser: 0,2 µm), wurde diese luftblasenfrei in das „Gel-Sandwich“ gegossen. Anschließend wurde der mitgelieferte Rechteck-Kamm eingesetzt. Die Polymerisierung erfolgte horizontal für 1,5 h. Nach dem Aushärten des Gels wurde das „Gel-Sandwich“ nach Angaben des Herstellers mit dem Puffertank versehen und in das Elektrophoresegerät eingebracht. Als Laufpuffer in der oberen und unteren Pufferkammer diente 1-fach TBE- Puffer. Der Kamm wurde nach Einfüllen des TBE-Puffers in dem oberen Puffertank gezogen.

Nach einem 25-minütigen „Pre-Run“ bei 1200 V und 45°C wurden die Proben beladen. 2 µl der verdauten Proben wurden mit 2 µl Stop/Loading Buffer (Sequi Therm EXCEL II-LC, Epicentre, Madison, USA) versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis transferiert. Auch der Längenstandard (Size Standard IRDye 700, 50-700 bp, Licor, Lincoln, USA) wurde vor Verwendung denaturiert. Bevor die Proben in die Geltaschen gefüllt wurden, wurden diese mit Laufpuffer ausgespült, um Harnstoffreste zu entfernen. 1 µl der Proben und 0,7 µl Längenstandard wurden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 4 h bei 1200 V und 45°C. Die Auswertung der Bandenmuster erfolgte mit Hilfe der Software GelQuest (Sequentix, Klein Raden, Deutschland).

Tabelle 2.11: Zusammensetzung des verwendeten 5 x TBE-Puffers (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Bestandteile	Menge	Endkonzentration
Borsäure	27,52 g	0,445 M
EDTA-Na ₂ x 2 H ₂ O	3,72 g	0,01 M
Tris	53,91 g	0,445 M
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Tabelle 2.12: Verwendete Restriktionsenzyme, Puffer und Inkubationsbedingungen.

Enzym	Schnittstelle 5' - 3'	Reaktionspuffer	Inkubation	Referenz
<i>MBN</i> ^b	n.z. ^a	10x MBN Reaction buffer	30°C / 1 h	Egert et al., 2003
<i>HaeIII</i>	GG [^] CC	Buffer R	37 °C / 1,5 h	Massol-Deya et al., 1995
<i>TaqI</i>	T [^] CGA	NE Buffer 3	65 °C / 2 h	Kemnitz et al., 2007

^a nicht zutreffend^b Mung Bean Nuclease

2.9.8.4. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)- Analyse

Mittels RFLP-Analyse wurden klonierte 16S rRNA Gene (2.9.9.) von *Bacteria* mit *HaeIII* und von *Archaea* mit *TaqI* (Tabelle 2.12) verdaut. Auf diese Weise erhält man für unterschiedliche klonierte 16S rRNA Gensequenzen verschiedene Restriktionsfragmente und die Auswahl repräsentativer Klone zur Sequenzierung ist möglich. Pro Ansatz wurden 6 µl des PCR-Produkts mit 0,1 µl *HaeIII* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, 10 000 U µl⁻¹, Tabelle 2.12), 1 µl 10x Restriktionspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und 3 µl PCR-H₂O in einem Thermocycler (Biometra T-Gradient, Biometra, Göttingen, Deutschland) für 1,5 h bei 37°C verdaut. Zur Deaktivierung des Enzyms wurde die Temperatur zuletzt auf 65°C für 10 min erhöht. Die verdauten PCR-Produkte wurden in einem 3%-igem Agarosegel (2.9.8.1.) aufgetrennt.

2.9.9. Klonierung

Bei der Klonierung werden unbekannte DNA-Fragmente in einen Vektor eingebunden (Ligation) und anschließend in Wirtszellen (*Escherichia coli*) zur Vervielfältigung eingebracht (Transformation) (Sambrook et al., 1989). Die Klonierung erfolgte mit dem pGEM[®]-T Vector System II (Promega, Madison, WI, USA) nach Angaben des Herstellers.

2.9.9.1. Ligation

Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe des Enzyms T4 DNA Ligase in die Insertionsstelle (Multiple-Cloning-Site, MCS) des Vektors (pGEM-T) eingebaut. Der Vektor ist ein Plasmid mit einer Länge von etwa 3.000 bp. Der Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2x Rapid Ligation Buffer (60 mM Tris-HCl pH 7,8; 20 mM MgCl ₂ ; 20 mM Dithiothreitol; 2 mM ATP; 10% v/v Polyethylenglykol)	2,5 µl
pGEMT [®] -Vector (50 ng µl ⁻¹)	0,5 µl
PCR-Produkt (3-200 ng)	1,5 µl
T4 DNA Ligase (3 Weiss Einheiten µl ⁻¹)	0,5 µl

Die Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut, kurz zentrifugiert und zusammenpipettiert. Die Inkubation erfolgte in einem Wasserbad (10°C), das über Nacht bei 4°C gelagert wurde. Durch Abkühlen von 10 auf 4°C wurde die optimale Ligationstemperatur durchschritten, die in dieser Spanne liegt.

2.9.9.2. Transformation

Im Anschluss an die Ligation wird der gesamte Vektor in kompetente Zellen eingeschleust. Hierfür wurden *E. coli* JM 109 kompetente Zellen (High Efficiency > 10⁸ cfu µg⁻¹) von Promega verwendet, welche bei -80°C gelagert waren und auf Eis aufgetaut wurden. Diese Zellen können leicht Plasmide aufnehmen, und besitzen weder eine Ampicillinresistenz noch ein *lacZ*-Gen, was für die anschließende Auswahl von Klonen entscheidend ist. In einem auf Eis vorgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 1 µl Ligationsansatz mit 25 µl kompetenten Zellen vorsichtig vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. In einem auf 42°C justierten Wasserbad wurden die Zellen für 45-50 s einem Hitzeschock ausgesetzt und erneut für 2 min auf Eis platziert. Nach Zugabe von 475 µl SOC-Medium (2.4.2.4) wurde der Transformationsansatz für 1,5 h bei 37°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) geschüttelt. Jeweils 250 µl wurden auf LB-Platten mit Ampicillin/IPTG/X-Gal (2.4.2.5.) mit einem Trigalski-Spatel ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und im Anschluss bei 4°C gelagert.

2.9.9.3. Klon-Screening und Insertkontrolle

Der Vektor besitzt eine Ampicillinresistenzkassette, wodurch die Klone nach Aufnahme eines Plasmids die Fähigkeit erlangen auf den LB-Platten mit Ampicillin/IPTG/X-Gal zu wachsen. Eine Auswahl an repräsentativen Klonen kann nun durch weitere Screening-Verfahren getroffen werden (Sambrook et al., 1989). Das Prinzip des Blau/Weiß-Screenings beruht darauf, dass das im Medium vorhandene farblose X-Gal durch das Enzym β -Galactosidase in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo umgewandelt wird. Da der Vektor über das Gen *lacZ* verfügt, welches das Enzym β -Galactosidase codiert und in der Insertionsstelle liegt, kann keine funktionelle β -Galactosidase im Wirtstamm exprimiert werden, wenn ein DNA-Fragment erfolgreich in den Vektor eingebunden wurde. Bei Klonen, die ein Insert im Plasmid tragen, ist das für die β -Galactosidase kodierende *lacZ* Gen unterbrochen und die Kolonien bleiben weiß. Klone, die im Plasmid kein Insert tragen, setzen X-Gal um und die Kolonien färben sich blau. Alle weißen Kolonien wurden mit Hilfe steriler Zahnstocher auf neue LB-Platten mit Ampicillin/IPTG/X-Gal übertragen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Überprüfung der Insertlänge wurde Zellmasse der weißen Klone als Matrize einer Direkt-PCR mit M13F/M13R Primern eingesetzt und das Insert amplifiziert (2.9.6.2.). Die amplifizierten Klone wurden mittels RFLP analysiert (2.9.8.4.), um gleiche Klone von der weiteren Analyse auszuschließen. Eine Restriktion ermöglicht zusätzlich einen Vergleich und eine Abschätzung der mikrobiellen Diversität der einzelnen Genbibliotheken. Basierend auf den RFLP-Mustern wurden repräsentative Klone zur Sequenzierung des Inserts ausgewählt und die PCR-Produkte aufgereinigt (2.9.7.).

2.9.10. Sequenzanalyse und Stammbaumberechnung

Die Sequenzierung wurde von Macrogen (Seoul, Südkorea) durchgeführt. Mit dem Programm BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) wurde die Qualität der Sequenzen überprüft sowie Primer- und Vektorsequenz entfernt. Sequenzanalyse und Stammbaumberechnungen erfolgten mit dem Softwarepaket ARB (<http://www.arb-home.de>; Ludwig et al., 2004) und WUBlast2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequenzen wurden mit dem FastAligner

align, den die ARB-Software beinhaltet. Das Alignment wurde manuell verbessert. Die phylogenetische Einordnung der eigenen Gensequenzen erfolgte nach Stackebrandt & Ebers, 2006. Baumberechnungen basierten auf 16S rRNA Sequenzen (700 - 900 bp) und erfolgten mittels Parsimony, Neighbor Joining und Maximum Likelihood Methoden. Konsensusbäume wurden durch die Nutzung von konsistenten Verzweigungen aller Methoden ermittelt (Ludwig et al., 1989).

Für die Berechnung gewurzelter Stammbäume wurden die Randgruppen (outgroups) *Thermocrinis albus* (AJ278895), *Aspergillus clavatoflavus* (U2923), *Clostridium acetobutylicum* (U16147) and *Thermoplasma acidophilum* (M20822) verwendet. *In silico* terminale Restriktionsfragmente (T-RFs) wurden mit T-RFcut (Ricke et al., 2005), das in ARB implementiert ist, erstellt. Diese wurden mit experimentell erhaltenen T-RFs verglichen, um sie mit 16S rRNA Sequenzen zu assoziieren.

Alle Sequenzen wurden in der Datenbank „EMBL Nucleotide Sequences Database“ (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) unter den Registrierungsnummern (Accession numbers) AM712557- AM712594, AM773590-AM773624, AM773917-AM773996, AM910653-AM910788 hinterlegt.

2.9.11. RNA Microarray

Zur schnellen Analyse der Archaeen Gemeinschaft im Niedermoor wurde basierend auf Kultivierung, SIP und 16S rRNA Genanalysen ein RNA Mikroarray mit archaeellen 16S rRNA-gerichteten Sonden erstellt.

2.9.11.1. *In vitro* Transkription und Fluoreszenzmarkierung von Amplikons

Zur Evaluierung des RNA Microarrays wurden die gewünschten Referenzsequenzen, die als Amplikons vorlagen, in RNA umgeschrieben und zur Detektion zugleich mit Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die *in vitro* Transkription und Fluoreszenzmarkierung der Amplikons wurde mit dem T7 RNA Polymerase Transkription Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und durch Verwendung von Atto647N- oder Atto550- markierten dUTPs (Jena Bioscience, Jena, Deutschland) durchgeführt. Die *in vitro* Transkription wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde ein Gemisch (1:3 v/v) aus unmarkierten und markierten dUTPs verwendet.

2.9.11.2. Fragmentierung von markierter RNA

Für 10 µl markierter RNA wurden verwendet:

1 µl 0.1 M ZnCl ₂
2 µl 1.0 M Tris-HCl (pH 7.4)

Das Gemisch wurde für 15 min bei 70°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis für 1-2 min gegeben. Nach kurzer Zentrifugation wurde 1 µl 0,5 M eiskaltes EDTA zugegeben, um die Fragmentierung zu stoppen. Nach Zugabe von 1 µl 40 U µl⁻¹ RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) wurden Aliquots erstellt (ca. 500 ng pro Reaktionsgefäß). Die Aliquots wurden im Dunkeln bei -20°C gelagert.

2.9.11.3. Sondenentwicklung

Die Sondenentwicklung erfolgte nach einem hierarchischen Konzept, wonach Sonden für eine Zielgruppe (target) auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen (z. B. Ordnung, Familie, Gattung) generiert wurden. Alle Sonden waren 18 Oligonukleotide lang und wurden von Microsynth (Balgach, Schweiz) erworben. *In silico* wurden die Sonden mit dem ARB Softwaretool „Design Probes“ anhand repräsentativer Sequenzen einer gewünschten phylogenetischen Gruppe, entwickelt. Dabei wurde beachtet, dass die Sondensequenz Fehlpaarungen (mismatches) zu Sequenzen unerwünschter phylogenetischer Gruppen besitzt, d. h. dass mindestens ein mismatch vorkam und dieser sich nicht am Sequenzende befand. Hier ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass das target trotzdem mit der Sonde bindet. Die Bindefähigkeit bzw. Spezifität der Sonden wurde mit dem ARB-Softwaretool „Match Probes“ und dem Internetprogramm „Greengenes“ (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-probe_locator.cgi) durchgeführt. Zusätzlich war zu beachten, dass alle Sonden eines Microarrays ähnliche Schmelztemperaturen (T_m , ermittelbar am G+C-Gehalt der Sequenz) und Bindungsenthalpien (ΔG) aufwiesen, um später eine geeignete Hybridisierungstemperatur für den Phylochip ermitteln zu können. Die Schmelztemperaturen und Bindungsenthalpien der Sonden wurden mit dem „2-state hybridization server“ der Internetseite des Rensselaer Polytechnic Institute „The Rensselaer bioinformatics web server“ berechnet (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/hybrid/twostate.php>).

Das 5' Ende jeder Oligonukleotidsonde besaß einen Anhang aus 15 dTTP Molekülen (T-spacer), um die Zugänglichkeit des targets zu der Sonde auf dem

Objektträger zu vergrößern (Shchepinov et al., 1997; Southern et al., 1999). Zusätzlich war das 5'-terminale Nukleotid jeder Sonde mit einer Aminogruppe modifiziert, damit die Sonden kovalent an die Aldehydgruppen der CSS-100 Objektträger (CEL Associates, Houston, Texas) binden. Die Konzentration der Sonden wurde auf 50 pmol μl^{-1} in 50% Dimethyl Sulfoxid (DMSO) eingestellt, um die Verdunstung des H_2O -Lösemittel-Gemisches während des Aufdruckens auf die Objektträger (spotting) zu beschleunigen. Zusätzlich wurden zur vollständigen Erfassung aller Archaeen und als Kontrollen bereits evaluierte und publizierte Sonden ausgewählt, die durch das Programm probeBase (Loy et al., 2007) ermittelt wurden (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: Verwendete und bereits etablierte Sonden

Name (Registrierungsnummer)	Sequenz (5'-3')	Zielgruppe	Referenz
ARC915 (pB-00027)	GTG CTC CCC CGC CAA TTC	<i>Archaea</i>	Stahl & Amann, 1991
EURY514 (pB-00792)	GCG GCG GCT GGC ACC	<i>Euryarchaeota</i>	Jurgens et al., 2000
CREN512 (pB-00788)	CGG CGG CTG ACA CCA G	<i>Crenarchaeota</i>	Jurgens et al., 2000
CREN569 (pB-00789)	GCT ACG GAT GCT TTA GG	<i>Crenarchaeota</i>	Jurgens et al., 2000
UNIV1389c (pB-00430)	ACG GGC GGT GTG TGC AAG	<i>Archaea</i>	Loy et al., 2002
EUB338 (pB-00159)	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	<i>Bacteria</i>	Amann et al., 1990
UNIV907 (pB-01235)	GAC GGG CGG TGT GTA CAA	Universell	Amann et al., 1992
UNIV1389 (pB-00429)	ACG GGC GGT GTG TAC AAA	<i>Eukarya</i>	Loy et al., 2002
MSMX860 ^a (pB-01147)	GGC TCG CTT CAC GGC TTC	<i>Methanosarcinales</i>	Raskin et al., 1994
MS1414 ^a (pB-01146)	CTC ACC CAT ACC TCA CTC	<i>Methanosarcina</i> , <i>Methanococcoides</i> , <i>Methanolobus</i>	Raskin et al., 1994
MS821 ^b (pB-01145)	CGC CAT GCC TGA CAC CTA	<i>Methanosarcina</i>	Raskin et al., 1994
NON EUB338 (pB-00243)	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	Negativ-Kontrolle (Komplement zu EUB338)	Wallner et al., 1993
CONT	AGG AAG GAA GGA AGG AAG	Positiv-Kontrolle	Loy et al., 2002

^a verkürzt um 3 Basen

^b verkürzt um 6 Basen

2.9.11.4. Spotting und Immobilisierung der Objektträger

Archaea-PhyloChips wurden durch einen Microarray Spotter, Modell: Omnigrid 100 (Genomic Solutions). Die Sonden wurden mit einer gespaltenen Nadel (Split-Pin) bei leichtem Kontakt und den angegebenen Einstellungen (Tabelle 2.14) aufgedruckt. Gedruckte *Archaea*-PhyloChips wurden über Nacht in einer geschlossenen Feuchtekammer (ca. 100% Luftfeuchte) bei 25°C inkubiert. Die Objektträger wurden zweimal bei Raumtemperatur in 0,2% Natriumdodecylsulfat (SDS) und anschließend zweimal in ddH₂O bei heftigem Schütteln gewaschen. Dadurch wurden ungebundene Sonden abgewaschen und später das SDS entfernt. Nachdem die Objektträger an der Luft getrocknet waren, wurden sie für 5 min in frisch angesetzter Natriumborohydrid-Lösung (1.0 g NaBH₄ in 300 ml Phosphat-gepufferter Saline [PBS] und 100 ml EtOH_{abs}) inkubiert, um die restlichen Aldehydgruppen auf dem Objektträger zu reduzieren. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von eiskaltem EtOH_{abs} abgebrochen. Die reduzierten Objektträger wurden dreimal mit 0,2% SDS und ddH₂O gewaschen, luftgetrocknet und im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Tabelle 2.14: Eingestellte Spotter Parameter.

Parameter	Einstellungen
Sondenfeld (Ausgangspunkt: obere rechte Ecke des Objektträgers)	Vertikal: 8500 microns Horizontal: 27000 microns
Punktgröße (horizontal & vertikal)	400 microns
Arraygröße (horizontal & vertikal)	1000 microns
Dauer des Aufdrucks pro Sonde	500 ms
Waschprozedur nach jeder Sonde	1,2 s Waschen in ddH ₂ O 2 s Ultraschall 1,1 s Waschen und Schütteln 7 s Trocknen

2.9.11.5. Hybridisierung

Es wurden ca. 500 ng der markierten und fragmentierten RNA für die Hybridisierung eingesetzt (ca. 5-10 µl). Bei der Spotting-Kontrolle mit dem Cy3-markiertem PolyA-Oktamer (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) wurde dem Hybridisierungspuffer kein Formamid zugesetzt (Tabelle 2.15). Anschließend wurden 210-215 µl Hybridisierungspuffer (Endvolumen 220 µl, Tabelle 2.15) und 1 µl eines Cy5-markiertem Kontroll-Oligonukleotids, das komplementär zur CONT Sonde ist (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland, Tabelle 2.13), zugegeben (Gesamtvolumen ca. 220 µl). Es folgte eine Denaturierung für 5 min bei 95°C und sofort im Anschluss ein Transfer auf Eis. Ungefähr 220 µl der Hybridisierungslösung wurden mit einer 1 ml Spritze (Hamilton, Darmstadt, Deutschland) in die Hybridisierungskammern des Slide Hybridizer, Modell: Lucidea SlidePro (GE Healthcare, München, Deutschland) gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 48, 50, 55, 60, 65, 70 oder 75°C für 12 h. Nach Einstellung der Hybridisierungstemperatur wurden die Objektträger mit 2 x SSC (15 µl s⁻¹) gewaschen. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 80%-igem Isopropanol (15 µl s⁻¹) und zuletzt wurden die Objektträger mit 100%-igem Isopropanol (15 µl s⁻¹) gespült. Nachdem die Objektträger getrocknet waren, wurden sie analysiert (2.8.11.6.).

Tabelle 2.15: Zusammensetzung des verwendeten Hybridisierungspuffers

Chemikalien	Mengen
20x SSC	600 µl
1 M Na ₂ HPO ₄ (pH 8.0)	100 µl
Formamid	X µl ^a
Wasser _{DEPC}	Y µl ^b
50x Denhardt's Reagenz	200 µl
10% SDS	100 µl

^a 0 µl bei einer Testhybridisierung mit Poly A-Oktamer; 100 µl bei einer Hybridisierung mit markierter RNA

^b 1 ml bei einer Testhybridisierung mit Poly A-Oktamer; 900 µl bei einer Hybridisierung mit markierter RNA

2.9.11.6. Visualisierung und Analyse

Fluoreszenzbilder des *Archaea*-PhyloChips wurden mit einem spezifischen Mikroarray-Scanner, Modell: FLA8000 (Fuji, Tokio, Japan) erstellt. Die Fluoreszenzsignale wurden durch die Software ArrayVision 8.0 (Imaging Research Inc., St. Catharines, Canada) bestimmt. Das gescannte Bild wurde mit einem Gitter aus verschiedenen Kreisen, die jeden Spot auf dem Microarray lokalisierten, überlagert. Dadurch konnte die Fluoreszenz jedes einzelnen Spots quantifiziert werden. Die durchschnittliche Signalintensität wurde für jeden Spot bestimmt. Zugleich wurde die durchschnittliche Signalintensität des Hintergrunds, der die Spots unmittelbar umgab, bestimmt. Die quantitative Analyse der digitalen Bilder erfolgte durch Bestimmung des Signal-zu-Hintergrund Quotienten (signal-to-noise ratio) für jede Sonde nach folgender Formel (nach Loy et al., 2002):

$$T = [I_P - (I_N - I_{NLB})] \times I_{PLB}^{-1}$$

T ist der signal-to-noise Quotient der Sonde

I_P ist die durchschnittliche Pixel Intensität von beiden spezifischen Sonden-Spots

I_N ist die durchschnittliche Pixel Intensität von beiden NONSENSE Sonden-Spots (beachte, dass $I_N - I_{NLB}$ immer einen höheren Wert als I_P haben muss)

I_{NLB} ist die durchschnittliche Pixel Intensität des lokalen Hintergrundbereiches um beide NONSENSE Sonden-Spots

I_{PLB} ist die durchschnittliche Pixel Intensität des lokalen Hintergrundbereichs um beide spezifische Sonden-Spots

Spots für die der signal-to-noise Quotient gleich oder größer als 2.0 war, wurde als positiv gewertet. Der signal-to-noise Quotient jeder Sonde sollte durch den signal-to-noise Quotienten der allgemeinen Archaeen-Sonde ARC915 des gleichen Microarrays geteilt werden, um das doppelte Signal der unterschiedlichen Archaeen-Sonden zu vergleichen. Dazu sollte folgende Formel verwendet (verändert nach Loy et al., 2002):

$$R = T \times \{[I_{ARC} - (I_N - I_{NLB})] \times I_{ARCLB}^{-1}\}^{-1}$$

R ist der normalisierte signal-to-noise Quotient der Sonde

T ist der signal-to-noise Quotient der Sonde

I_{ARC} ist die durchschnittliche Pixel Intensität aller ARC-Sonden-Spots

I_{ARCLB} ist die durchschnittliche Pixel Intensität des lokalen Hintergrunds um alle ARC915-Sonden-Spots

2.10. Verwendete Chemikalien und Gase

Die Herkunft der verwendeten Chemikalien sind, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Boehringer (Mannheim, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Bio-Rad (Richmond, CA., U. S. A.) und Merck (Darmstadt, Deutschland). Gase stammen von der Firma Linde AG (Höllenriegelskreuth, Deutschland, Tabelle 2.16).

Tabelle 2.16: Verwendete Gase und ihre Reinheit.

Gas	Druckluft	He	CO ₂	CH ₄	N ₂	H ₂
Reinheit	DIN 3188	4,6	technisch	3,5	5,0	5,0

2.11. Statistische Verfahren

2.11.1. Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler

Alle Experimente wurden in Replikaten durchgeführt. Mit dem Programm „Excel 2000“ wurden Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler, Regressionsgeraden und Korrelationskoeffizienten (R^2) berechnet.

2.11.2. Rarefaction Analyse

Die Rarefaction Analyse erfolgte mit der frei erhältlichen Software aRarefactWin (<http://www.uga.edu/~strata/AnRareReadme.html>). Rarefaction-Kurven basierten auf dem analytischen Annäherungsalgorithmus nach Hurlbert (1971).

2.11.3. SPSS, Cluster Analyse

Zur Bestimmung des Unterschieds zwischen den einzelnen DGGE Profile, wurden diese mit der Software SPSS 10.0.5 für Windows (SPSS Inc., München, Deutschland) analysiert. Dendrogramme wurden mit der Hierarchischen Clusteranalyse nach dem „Jaccard Index“ berechnet. Der Jaccard Index oder Jaccard Ähnlichkeitskoeffizient wird bei Statistiken verwendet, um die Ähnlichkeit und die Diversität eines Probensets (A und B) zu bestimmen. Der Jaccard Koeffizient ist definiert durch folgende Formel:

$$J(A,B) = |A \cap B| / |A \cup B|$$

Der Jaccard Abstand misst den Unterschied zwischen den Probensets und wird mit folgender Formel berechnet:

$$J_{\delta}(A,B) = 1 - J(A,B) = \frac{|A \cap B| - |A \cup B|}{|A \cup B|}$$

3. ERGEBNISSE

3.1. Kultivierung fakultativer Aerobier und obligater Anaerobier

Zur Untersuchung des anoxischen Abbaus von Biopolymeren durch fakultative Aerobier und/oder obligate Anaerobier wurden Mikroorganismen aus dem Moorboden in anoxischen Medien mit verschiedenen Polymeren (2.4.2.3.) als alleinige bzw. hauptsächliche Kohlenstoffquelle angereichert. Durch die Abwesenheit von alternativen Elektronenakzeptoren außer CO₂ sollten Fermentationsprozesse begünstigt werden und somit das Wachstum von fakultativ aeroben und obligat anaeroben Fermentierern stimuliert werden. Die 16S rRNA Gene der Anreicherungskulturen wurden identifiziert. Zudem sollten fakultative Aerobier bzw. obligate Anaerobier aus dem Moorboden isoliert werden.

3.1.1. Anreicherung fakultativer Aerobier und obligat Anaerobier

Anoxische Anreicherungskulturen waren bis zu den Verdünnungsstufen 10⁻² – 10⁻⁵ bewachsen (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Verdünnungsstufen wurde DNA extrahiert (Daten nicht gezeigt) und Konzentrationen von organischen Säuren und Alkoholen gemessen (Tabelle 3.1). Von 43 DNA-Proben wurden die *Bacteria*-16S rRNA Gene amplifiziert. Davon wurden genetische Fingerprints mittels DGGE erstellt (Daten nicht gezeigt). 25 amplifizierte 16S rRNA Gene zeigten unterschiedliche DGGE-Profile und wurden daher zur weiteren Analyse ausgewählt (Daten nicht gezeigt). In diesen 25 ausgewählten Anreicherungskulturen wurden verschiedene organische Säuren und Alkohole (z. B. Acetat, Ethanol, Formiat, Tabelle 3.1) detektiert. In Anreicherungen mit dem Substrat Butyrat wurden hauptsächlich Acetat (bis zu 6 mM), Propionat (ca. 2 mM) und H₂ (bis zu 0,1 mM) detektiert (Tabelle 3.1). In anoxischen Anreicherungen mit Cellobiose- oder Stärke als Substrat wurden Ethanol (bis zu 5 mM), Formiat (ca. 0,1 mM), Acetat (bis zu 16 mM), Propionat (bis zu 7 mM), Butyrat (bis zu 27 mM) und H₂ (bis zu 0,3 mM) detektiert (Tabelle 3.1). Formiat (ca. 0,5 mM), Acetat (bis zu 79 mM), Propionat (bis zu 9 mM), Iso-Butyrat (bis zu 3 mM), Butyrat (bis zu 28 mM) und Methylbutyrat (bis zu 4 mM) wurden in anoxischen Anreicherungen mit Gelatine als Substrat detektiert (Tabelle 3.1). In

anoxischen Anreicherungen mit Cellulose als Substrat wurden Formiat (ca. 0,1 mM), Acetat (bis zu 12 mM), Propionat (bis zu 6 mM), Butyrat (bis zu 3 mM), Methylbutyrat (bis zu 1 mM) und H₂ (ca. 0,1 mM) detektiert (Tabelle 3.1). In Anreicherungen mit dem Grundmedium (MH4 oder VL55; 2.4.2.1. und 2.4.2.2.) und ohne zusätzliche Substratzugabe wurden Formiat (bis zu 0,4 mM), Acetat (bis zu 5 mM), Propionat (bis zu 2 mM), Butyrat (bis zu 2 mM), Methylbutyrat (bis zu 0,6 mM) und vernachlässigbare Konzentrationen von H₂ (ca. 0,01 mM) detektiert (Tabelle 3.1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter anoxischen Bedingungen im sauren Moorboden Fermentationsprozesse durch abundante fakultativ aerobe und obligat anaerobe Fermentierer stattfinden.

16S rRNA Gene mit unterschiedlichen DGGE-Profilen wurden kloniert. 340 Klone hatten das richtige Insert mit einer Größe von ca. 900 bp. 60 Klone mit unterschiedlichen RFLP-Mustern wurden sequenziert und deren phylogenetische Zuordnung bestimmt (2.9.10., Tabelle 3.2). Es wurden phylogenetisch diverse, im Moorboden abundante und potentiell neue Organismen detektiert (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.1: Detektierte organische Verbindungen in anoxischen Anreicherungskulturen.

Probe	mM												H ₂
	Glucose	Ethanol	Propanol	Succinat	Lactat	Formiat	Acetat	Propionat	Iso-Butyrat	Butyrat	Methyl-butyrat	Valerian-säure	
1B-2 ^a	n.d. ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	5,6	2	0,4	2	0,8	n.d.	0,01
1B-5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,68	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	0,2	0,4
1Cb-2	8,1	3	0,6	n.d.	1	0,05	5,0	4	0,2	6	0,4	0,1	n.d.
1Cb-5	0,1	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	0,06	2,9	1	0,4	3	0,6	n.d.	0,1
1Cl-2	0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,09	4,1	4	0,4	3	0,9	0,2	0,1
1Cl-4	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	12	6	0,4	2	0,4	0,2	0,19
1G-4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,4	76	12	3	n.d.	4	n.d.	n.d.
1n-4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,4	2,8	2	0,3	1	0,6	0,1	n.d.
1P-5	0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,63	0,1	n.d.	0,4	n.d.	n.d.	0,5
1S-5	52	12	2	n.d.	5	0,04	16	6	n.d.	27	0,03	0,1	0,3
2B-2	0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	3,2	1	0,09	2	0,08	0,03	0,1
2Cl-2	0,4	0,3	n.d.	n.d.	0,2	0,03	2,2	0,3	0,7	0,1	0,1	2	0,01
2Cl-4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,04	0,06	1,3	0,5	0,05	0,2	0,05	n.d.	0,1
2G-5	n.d.	0,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43	11	1	12	2	1	0,03
2P-4	0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16	3	0,6	n.d.	0,6	n.d.	0,3
2S-2	n.d.	5	1	0,096	n.d.	0,2	15	7	1	2	0,2	n.d.	7
2S-4	n.d.	2	0,2	0,014	n.d.	0,07	5,0	1	0,2	5	n.d.	7	1,8
3Cb-2	0,7	0,5	0,1	0,12	n.d.	0,2	1,4	0,9	0,5	3	n.d.	n.d.	0,01
3Cb-4	0,1	0,09	n.d.	0,032	n.d.	0,04	0,76	0,3	0,4	0,7	n.d.	n.d.	2
3G-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,4	68	12	3	28	4	n.d.	0,1
3G-3	n.d.	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	0,4	79	9	3	n.d.	4	n.d.	0,4
3n-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,1	5,2	0,6	0,2	2	0,2	n.d.	0,1
3n-3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,94	0,1	0,06	0,4	0,04	n.d.	0,01
3S-2	5	5	1	0,57	n.d.	1	9,4	6	0,04	13	n.d.	0,1	0,03
3S-3	5	5	1	0,55	n.d.	0,8	9,4	6	0,04	13	n.d.	0,1	1

^a 1= MH4 (2.4.2.1.); 2= MH4v (2.4.2.1.); 3= VL55 (2.4.2.2.); B= Butyrat, Cb= Cellobiose; Cl= Cellulose; G= Gelatine; n= ohne Substrat; S= Stärke; P= Pektin; und Angabe der Verdünnungsstufe (MH4 und MH4v enthielt geringe Mengen an Trypton und Hefeextrakt)

^b nicht detektiert

16S rRNA Gensequenzen, die *Skermanella parooense* (X90760) und *Rhodoblastus acidophilus* (M34128, beide mit 90% Sequenzähnlichkeit) zugeordnet wurden, stammten aus den Verdünnungsstufen 10^{-4} aus dem Medium MH4v mit Pektin. 16S rRNA Gensequenzen, die *Chromobacterium violaceum* Stamm 52 (AY117554; 90-94% Sequenzähnlichkeit) zugeordnet wurden, stammten aus Medien mit Cellulose, Cellobiose, Pektin oder Gelatine. Dass diese Sequenz aus der höchst bewachsenen Verdünnung (10^{-5}) des Mediums MH4 mit Cellobiose stammte, deutet darauf hin, dass *Chromobacterium violaceum* (AY117554) abundant mit bis zu 10^5 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ im Moorboden ist. Eine 16S rRNA Gensequenz, die *Thiobacillus denitrificans* (AJ243144, < 90% Sequenzähnlichkeit) innerhalb der *Hydrogenophilaceae* zugeordnet wurde, stammte aus Medium MH4 mit Gelatine aus der Verdünnung 10^{-4} . 16S rRNA Gensequenzen, die *Serratia* sp., *Rahnella* sp., *Yersinia* sp. und *Budvicia* sp. (96-99% Sequenzähnlichkeit) zugeordnet wurden, stammten aus Medien mit Cellulose, Cellobiose, Stärke oder Gelatine. 16S rRNA Gensequenzen, die *Rahnella* und *Budvicia* zugeordnet wurden, stammten aus der höchst bewachsenen Verdünnung (10^{-5}) der Medien mit Stärke. Mehrere 16S rRNA Gensequenzen, die *Pseudomonas veronii* (AF064460, 96-99% Sequenzähnlichkeit) zugeordnet wurden, stammten aus dem Medium MH4 und MH4v mit Gelatine, Cellulose, Pektin und Butyrat. 16S rRNA Gensequenzen, die den *Bacteroidales* (< 92% Sequenzähnlichkeit) zugeordnet wurden, stammten aus der Verdünnung 10^{-4} des Mediums MH4 mit Cellulose oder Butyrat. Der Familie *Clostridiaceae* zugeordnete 16S rRNA Gensequenzen (> 98% Sequenzähnlichkeit) konnten nur in Medium mit Cellulose bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} detektiert werden. Der Familie *Acidaminococcaceae* wurden zwei 16S rRNA Gensequenzen (90 und 99% Sequenzähnlichkeit) zugeordnet, die nur in Medium MH4 mit Cellulose bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} detektiert wurden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass phylogenetisch diverse Mitglieder der *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes* und *Clostridia* abundante (> 10^5 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$) potentielle Fermentierer im Niedermoor sind.

Tabelle 3.2: Phylogenetische Zuordnung der klonierten repräsentativen 16S rRNA Gene der Anreicherung, deren Ursprung und Substrat.

Zuordnung der Sequenz ^a (Registrierungsnummer; Anzahl der Sequenzen)	Ur- sprung ^b	Substrat	Nächster kultivierter Verwandter (Registrierungsnummer)	Ähn- lichkeit (%)
<i>Alphaproteobacteria</i>				
<i>Rhododspirillaceae</i>				
C-2P4-A1 ^c (AM910689)	4	Pektin	<i>Skermanella parooense</i> (X90760)	90
<i>Bradyrhizobiaceae</i>				
C-2P4-A10 (AM910694)	4	Pektin	<i>Rhodoblastus acidophilus</i> (M34128)	<90
<i>Betaproteobacteria</i>				
<i>Neisseriaceae</i>				
C-1Cl2-A5 (AM910691, 3)	2	Cellulose	<i>Chromobacterium violaceum</i> (AY117554)	91-92
C-2P4-A3 (AM910690, 6)	4	Pektin	<i>Chromobacterium violaceum</i> (AY117554)	90-94
C-1G4-A3 (AM910662)	4	Gelatine	<i>Chromobacterium violaceum</i> (AY117554)	94
C-1Cb5-A1 (AM910673, 2)	5	Cellobiose	<i>Chromobacterium violaceum</i> (AY117554)	92, 94
C-1n4-A8 (AM910659)	4	Trypton/Yeast	<i>Chromobacterium violaceum</i> (AY117554)	92
<i>Hydrogenophilaceae</i>				
C-1G4-A6 (AM910664)	4	Gelatine	<i>Thiobacillus denitrificans</i> (AJ243144)	88
<i>Gammaproteobacteria</i>				
<i>Enterobacteriaceae</i>				
C-1n4-A1 (AM910653, 2)	4	Trypton/Yeast	<i>Serratia quinovorans</i> (AJ279052)	99
C-1G4-A5 (AM910663, 2)	4	Gelatine	<i>Serratia fonticola</i> (AF286869)	>99
C-1S5-A1 (AM910675)	5	Stärke	<i>Rahnella aquatilis</i> (X79937)	97
C-2Cl2-A1 (AM910699)	2	Cellulose	<i>Rahnella aquatilis</i> (X79937)	96
C-1Cb2-A3 (AM910666, 4)	2	Cellobiose	<i>Yersinia rohdei</i> (AF366384)	96
C-1Cb2-A9 (AM910672)	2	Cellobiose	<i>Budvicia aquatica</i> (AJ233407)	96
C-1S5-A2 (AM910676, 4)	5	Stärke	<i>Budvicia aquatica</i> (AJ233407)	96
<i>Pseudomonadaceae</i>				
C-1n4-A7 (AM910658, 2)	4	Trypton/Yeast	<i>Pseudomonas veronii</i> (AF064460)	96
C-2G5-A1 (AM910688)	5	Gelatine	<i>Pseudomonas veronii</i> (AF064460)	96
C-2P4-A8 (AM910692)	4	Pektin	<i>Pseudomonas veronii</i> (AF064460)	96
C-1Cl4-A5 (AM910711, 2)	4	Cellulose	<i>Pseudomonas veronii</i> (AF064460)	96
C-1B2-A6 (AM910686, 2)	2	Butyrat	<i>Pseudomonas veronii</i> (AF064460)	96
<i>Bacteroidetes</i>				
<i>Bacteridales</i>				
C-1Cl4-A4 (AM910710)	4	Cellulose	<i>Alkaliflexus imshenetskii</i> (AJ784993)	84
C-1n4-A6 (AM910657)	4	Trypton/Yeast	<i>Bacteroides uniformis</i> (AB117564)	91
C-1B2-A5 (AM910685)	2	Butyrat	<i>Bacteroides uniformis</i> (AB117564)	92
<i>Clostridia</i>				
<i>Clostridiaceae</i>				
C-1Cl4-A2 (AM910708)	4	Cellulose	<i>Clostridium scatologenes</i> (M59104)	98
C-2Cl4-A1 (AM910701, 7)	4	Cellulose	<i>Clostridium acidisoli</i> (AJ237756)	99
<i>Acidaminococcaceae</i>				
C-1n4-A4 (AM910656, 2)	4	Trypton/Yeast	<i>Sporomusa aerivorans</i> (AJ506191)	90
C-1Cb2-A8 (AM910671, 2)	2, 5	Cellobiose	<i>Zymophilus paucivorans</i> (AF373025)	99

^a Sequenzlänge 900-1000 bp

^b Verdünnungsstufe

^c Kodierung: C = Klon; 1= MH4 (2.3.2.1.); 2= MH4v (2.3.2.1.); 3= VL55 (2.3.2.2.); B= Butyrat, Cb= Cellobiose; Cl= Cellulose; G= Gelatine; n= ohne Substrat; S= Stärke; P= Pektin; Angabe der Verdünnungsstufe; Ax = RFLP-Muster

3.1.2. Isolierung fakultativer Aerobier

Die Isolierung potentieller Fermentierer erfolgte aus Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen oxischen Flüssig- und Festmedien bzw. anoxischen Festmedien (2.7.). Dabei wurde in oxischen Flüssig- und Festmedien Wachstum bis zur Verdünnungsstufe 10^{-9} detektiert, wobei im Ansatz mit anoxischen Festmedien ein Wachstum bis zur Verdünnungsstufe 10^{-6} detektiert wurde.

Insgesamt konnten 267 Mikroorganismen mit unterschiedlicher Koloniemorphologie aus oxischen und anoxischen Medienansätzen isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Aus oxischen Flüssigmedien wurden nach Ausplattierung auf oxische Festmedien und mehrmaligen Transfer, 46 unterschiedliche Kolonien detektiert (Abbildung 3.1). Einzelkolonien wurden in anoxisches Flüssigmedium transferiert, um die Fähigkeit zu anaerobem Wachstum oder ein Überleben unter anoxischen Bedingungen zu untersuchen. Auf oxischen Festmedien konnten 106 verschiedene Kolonien detektiert werden (Abbildung 3.1). Nach 3 Transfers auf oxisches Festmedium wurde durch die Überführung von Einzelkolonien in anoxisches Flüssigmedium, die Fähigkeit zu anaerobem Wachstum oder ein Überleben unter anoxischen Bedingungen untersucht. Aus beiden Ansätzen wurde die 16S rRNA Gene von insgesamt 152 Mikroben erfolgreich amplifiziert. Nach RFLP-Analyse (Daten nicht gezeigt) zeigte sich, dass sich von diesen 152 unterschiedlichen Phänotypen 32 auf phylogenetischer Ebene unterschieden. Von diesen OTUs konnten sieben 16S rRNA Gensequenzen identifiziert werden (Abbildung 3.1). Diese Organismen wurden durch weitere Transfers von Einzelkolonien isoliert. Die sieben identifizierten Isolate konnten drei unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden (Tabelle 3.3). Aus anoxischen Festmedien konnten die 16S rRNA Gene der Isolate nicht erfolgreich sequenziert und somit identifiziert werden (Abbildung 3.1).

Die Reinheit der Isolate wurde mittels Mikroskopie (2.7.3.) und DGGE (2.9.8.2.) geprüft. Bei der mikroskopischen Untersuchung der Isolate wurde jeweils nur eine Zellmorphologie pro Isolat detektiert (Tabelle 3.3). Die DGGE-Analyse zeigte für jedes Isolat eine einzelne Bande, was darauf hindeutet, dass es sich bei jedem Isolat um einen einzigen Organismus handelt (Daten nicht gezeigt). Somit wurden sieben abundante, fakultativ aerobe Fermentierer aus dem Niedermoor isoliert.

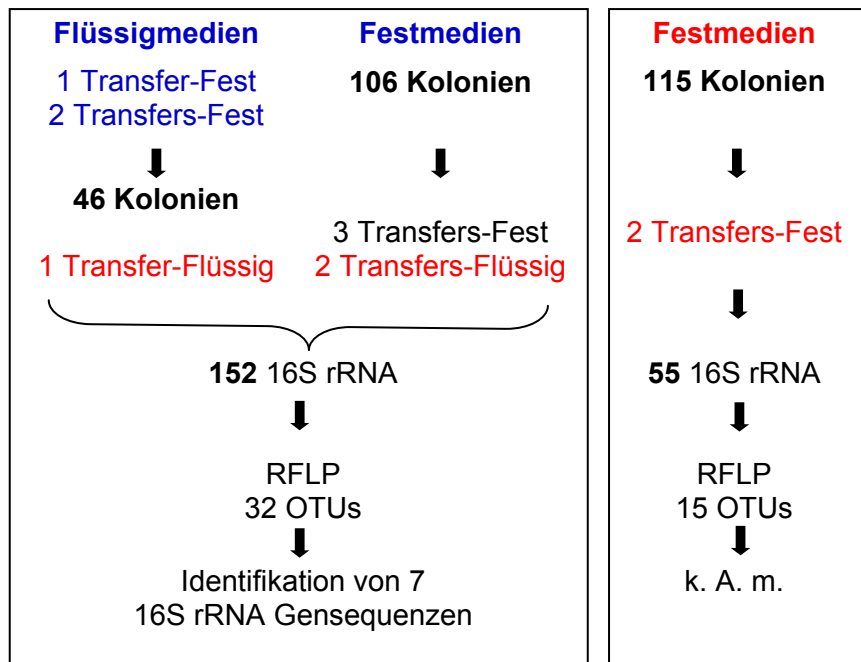


Abbildung 3.1: Flussdiagramm über die Isolierungsansätze von potentiellen Fermentierern. Fette Schrift markiert die Anzahl der unterschiedlichen detektierten Kolonien oder 16S rRNA Gene. Blaue Schrift bedeutet Kultivierung unter oxischen Bedingungen und rote Schrift Kultivierung unter anoxischen Bedingungen. Abkürzungen: Fest, Festmedium; Flüssig, Flüssigmedium; RFLP, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus- Analyse; OTUs, operational taxonomic units; k. A. m.: keine Angaben möglich, da die Sequenzierung der 16S rRNA nicht erfolgreich war.

Das aus Medium MH4 mit Stärke stammende Isolat 1S-9Ac wuchs bis zu 10^9 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$. Die Isolate 3GF-2a und 3P-2Ad stammten aus Medium VL55 und wuchsen mit Gelatine und Pektin bis zu 10^2 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$. Die nächste verwandte Art der Isolate 1S-9Ac, 3GF-2a und 3P-2Ad (Tabelle 3.3) war *Burkholderia phenazinium* mit einer Sequenzähnlichkeit von 93-98%. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass potentiell neue säure-tolerante fakultative Arten innerhalb der *Burkholderiales* im Moorboden abundant sind. Zwei Isolate (1S-8Ah, 2B-6Aa), die in Medien MH4 (1) bzw. MH4v (2) mit Stärke oder Butyrat bis zu $> 10^6$ Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ wuchsen, waren nah verwandt zu *Serratia fonticola* LMG 7882 (AF286869) mit einer Sequenzähnlichkeit von 98% (Tabelle 3.3). Das Isolat 2X-6Bb war nah verwandt (96% Sequenzähnlichkeit) zu *Rahnella aquatilis* (X79937) und wuchs auf Medium MH4v mit Xylan bis zu 10^6 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$. Das aus Medium MH4 mit Gelatine stammende

Isolat 1GF-2a (10^2 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$) war nah verwandt zu *Pseudomonas veronii* (AF064460) mit einer Sequenzähnlichkeit von 99%.

Um das Wachstum der Isolate unter oxischen und anoxischen Bedingungen genauer zu untersuchen, wurde zu den jeweiligen anoxischen Grundmedien (MH4, MH4v und VL55) 1 mM Glucose gegeben und bei 30°C inkubiert. Das Isolat 1S-9Ac zeigte sowohl unter oxischen als auch unter anoxischen Bedingungen Wachstum (Abbildung 3.2 A und B). Nach 6 Tagen anoxischer Inkubation wurden 0,2 mM Ethanol, 0,5 mM Lactat, 0,4 mM Formiat, 0,2 mM Acetat und 0,4 mM Valeriansäure detektiert (Abbildung 3.3). Das Isolat 1S-8Ah wuchs ebenfalls unter oxischen und anoxischen Bedingungen (Abbildung 3.2 A und B) und nach 6 Inkubationstagen unter anoxischen Bedingungen wurden 0,7 mM Ethanol, 0,3 mM Lactat, 0,1 mM Formiat, 1 mM Acetat und 0,2 mM Butyrat und 0,4 mM Valeriansäure detektiert. Des weiteren wurde auch für das Isolat 2X-6Bb Wachstum unter oxischen und anoxischen Bedingungen detektiert (Abbildung 3.2 A und B), wobei nach 6 Inkubationstagen unter anoxischen Bedingungen Glucose zu 0,3 mM Ethanol, 0,3 mM Lactat, 0,1 mM Formiat, 0,4 mM Acetat und 0,1 mM Butyrat abgebaut wurde (Abbildung 3.3). Das Isolat 1GF-2a wuchs bei Zugabe von Glucose unter oxischen und anoxischen Bedingungen (Abbildungen 3.2 A und B) und bildete unter anoxischen Bedingungen 0,8 mM Ethanol, 0,1 mM Succinat, 0,6 mM Lactat, 0,1 mM Formiat, 0,4 mM Acetat und 0,2 mM Butyrat (Abbildung 3.3). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass fakultativ aerobe Mitglieder der *Burkholderiales*, *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonadaceae* Monosaccharide (z. B. Glucose) im Niedermoor vergären und potentiell neue Arten der *Burkholderiaceae* sowie *Enterobacteriaceae* isoliert wurden.

Für die Isolate 2B-6Aa, 3GF-2a und 3P-2Ad wurde eine geringe Steigung der optischen Dichte und der CO_2 Konzentrationen, sowie eine minimale Abnahme der Glucose Konzentration unter anoxischen Bedingungen detektiert (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass diese Isolate Glucose nicht als Substrat für anaerobes Wachstum nutzen oder bei einer Inkubationstemperatur von 30°C nicht wachsen können.

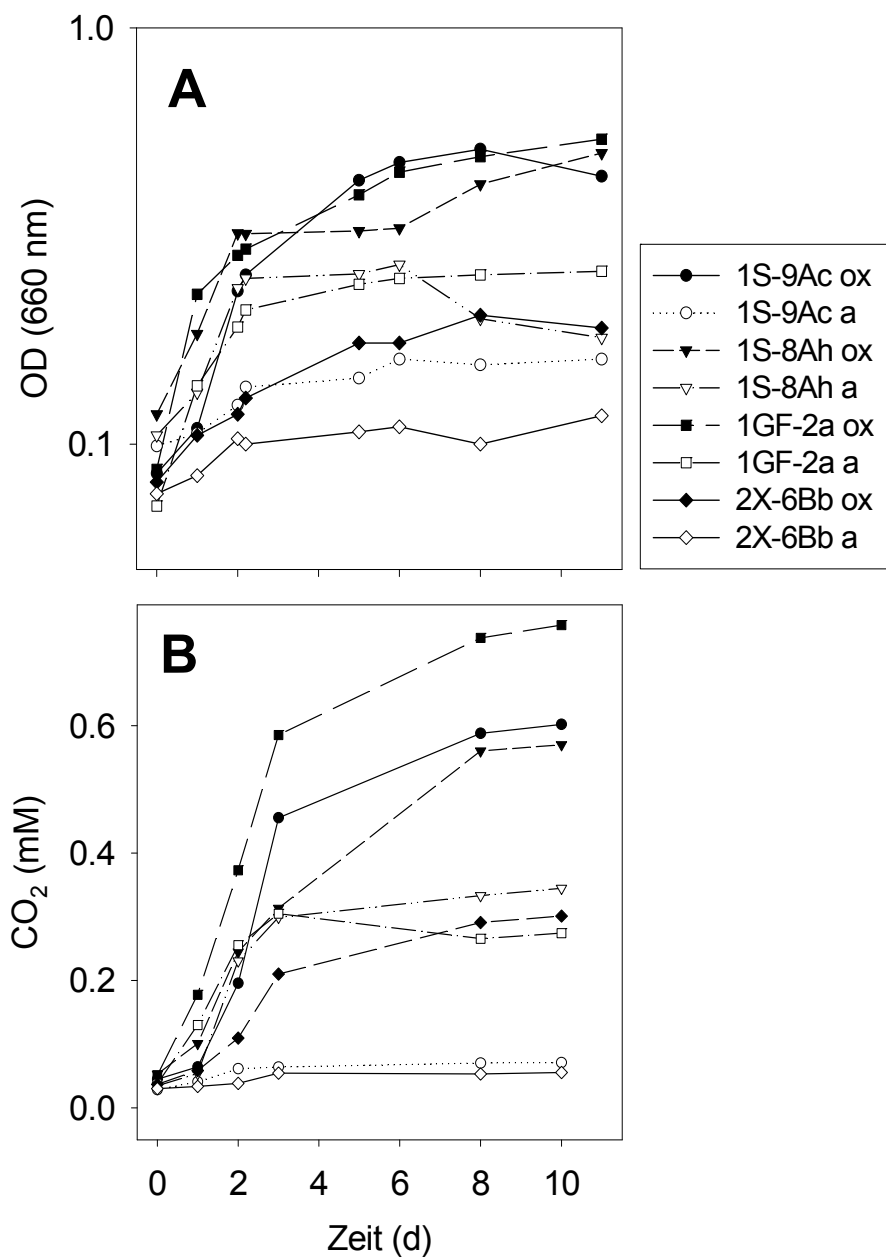


Abbildung 3.2: Die optische Dichte (OD, halblogarithmische Auftragung, A) und CO₂ Konzentrationen (B) der Isolate in Medien (2.3.2.) mit 1 mM Glucose bei einer Inkubationstemperatur von 30°C unter oxischen (ox) oder anoxischen (a) Bedingungen. Kodierung: 1, Medium MH4; 2, Medium MH4v; S, aus Medium mit Stärke isoliert; G, aus Medium mit Gelatine isoliert; X, aus Medium mit Xylan isoliert; Verdünnungsstufe aus dem das Isolat stammte und Koloniennummer.

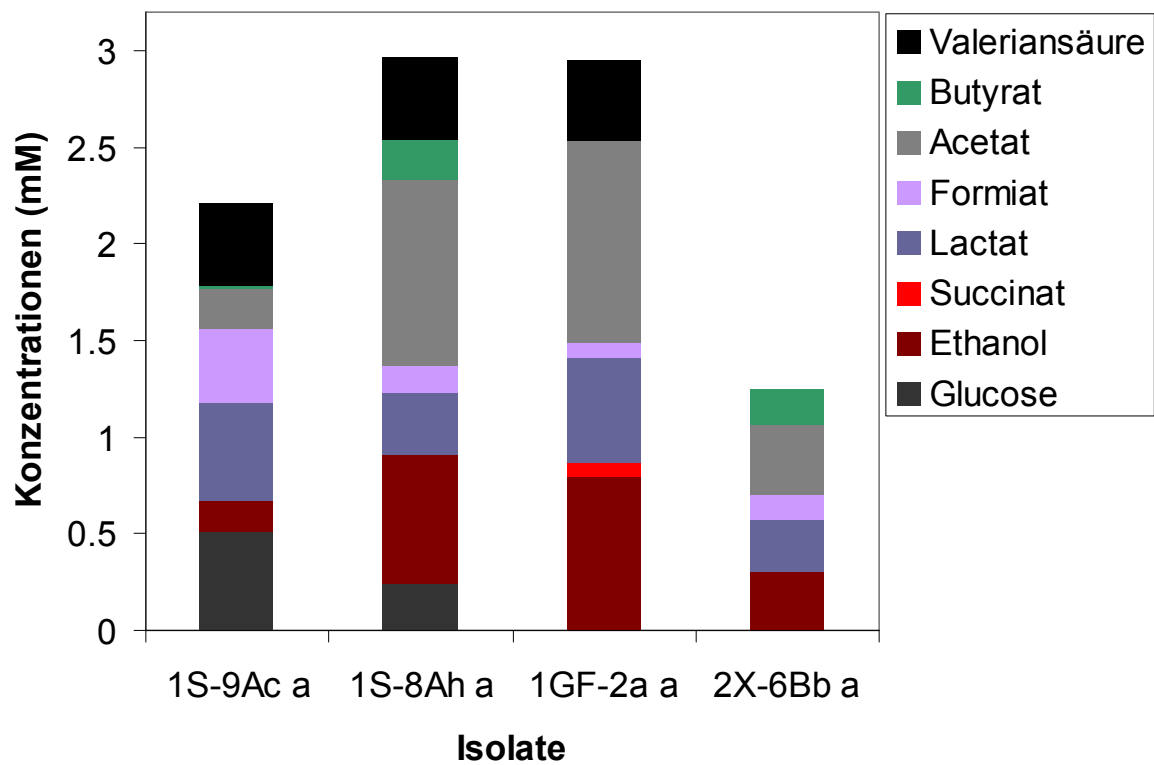









Abbildung 3.3: Einfluss von 1 mM Glucose auf das anaerobe Wachstum der Isolate 1S-9Ac, 1S-8Ah, 1GF-2a und 2X-6Bb nach 6 Tagen Inkubation bei 30°C. Kodierung: 1, Medium MH4; 2, Medium MH4v; S, aus Medium mit Stärke isoliert; G, aus Medium mit Gelatine isoliert; X, aus Medium mit Xylan isoliert; Verdünnungsstufe aus dem das Isolat stammte und Koloniennummer; a, anoxische Inkubationsbedingung.

Tabelle 3.3: Phylogenetische Zuordnung der Isolate, deren Ursprung, Substrat, Kolonie- und Zellmorphologie.

Zuordnung der Sequenz ^a (Registrierungsnummer)	Ursprung ^b	Substrat	Zell- morphologie	Koloniemorphologie	Nächster kultivierter Verwandter (Registrierungsnummer)	Ähn- lichkeit (%) ^d
<i>Betaproteobacteria</i>						
<i>Burkholderiaceae</i>						
1S-9Ac ^c (AM910715)	>6	Stärke	Mobile kurze Stäbchen	Glatt, gelblich pigmentiert, glänzend, kreisförmig, ganzrandig, konvex	 <i>Burkholderia phenazinium</i> (AY154375)	93
3GF-2a (AM910713)	2	Gelatine	Mobile Stäbchen	Stumpf/fädig, milchig, gefranst, fransig, erhaben	 <i>Burkholderia phenazinium</i> (AM86236)	95
3P-2Ad (AM910718)	2	Pektin	Mobile kurze Stäbchen	Glänzend, weiß undurchsichtig, schleimig, kreisförmig, konvex	 <i>Burkholderia phenazinium</i> (AM86236)	98
<i>Gammaproteobacteria</i>						
<i>Enterobacteriaceae</i>						
1S-8Ah (AM910714)	>6	Stärke	Kurze Stäbchen	Glänzend, gelblich pigmentiert, undurchsichtig, unregelmäßig, kegelförmig	 <i>Serratia fonticola</i> LMG 7882 (AF286869)	98
2B-6Aa (AM910716)	6	Butyrat	Mobile Stäbchen	Glänzend, weiß undurchsichtig, unregelmäßig, kegelförmig	 <i>Serratia fonticola</i> LMG 7882 (AF286869)	98
2X-6Bb (AM910717)	6	Xylan	Mobile lange Stäbchen	Glänzend, rosa Pigmentierung, rund, ganzrandig, konvex	 <i>Rahnella aquatilis</i> (X79937)	96
<i>Pseudomonadaceae</i>						
1GF-2a (AM910719)	2	Gelatine	Stäbchen	Stumpf, rund, weiß undurchsichtig, ganzrandig, konvex	 <i>Pseudomonas veronii</i> (AF064460)	99

^a Sequenzlänge 900-1000 bp

^b Verdünnung 10^x

^c Kodierung siehe Abbildung 3.3

^d Basierend auf WUBlast2-Ergebnissen (2.9.10.)

3.2. Effekt von Ethanol, Xylose und Glucose auf den Kohlenstofffluss im sauren Niedermoor

Da durch 16S rRNA Stable isotope probing (SIP) die aktive Mikrobiota und deren Funktion in Ökosystemen identifiziert werden kann (Dumont & Murrell, 2005), wurde Moorboden unter anoxischen Bedingungen mit stabilen Isotopen, wie ^{13}C -Ethanol, Xylose oder Glucose inkubiert (2.8.). Intermediate im anaeroben Kohlenstofffluss zu CH_4 und die daran beteiligten Mikroorganismen wurden identifiziert.

3.2.1. Vorinkubationen

Anoxische Moorbodenaufschlammungen wurden für 8 Tage inkubiert (2.8.1.) bevor das jeweilige Substrat zugegeben wurde, um sicher zustellen, dass vernachlässigbare Mengen an alternativen Elektronenakzeptoren außer CO_2 vorhanden waren und somit Fermentation und Methanogenese begünstigt wurde. Die Anfangskonzentrationen im Moorboden betrugen für Fe(II) 1,3 μM , für Nitrat 0,3 mM und für Sulfat 0,7 mM. Nach 8 Tagen betrug die Konzentration von Fe(II) 6 μM , von Nitrat 0,1 mM und von Sulfat 0,2 mM. Dies deutete darauf hin, dass die detektierten alternativen Elektronenakzeptoren reduziert worden waren.

3.2.2. Effekt von Ethanol auf den Kohlenstofffluss

Ca. 0,5 mM Ethanol wurde in den Inkubationen nach 15 Tagen verbraucht, wobei nach einer weiteren Zugabe von ca. 0,5 mM Ethanol dieses nach 10 Tagen, d. h. bis zum 25. Inkubationstag verbraucht war (Abbildung 3.5 A). Ca. 41,3 $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{CO}_2$ wurde bis zum 25. Inkubationstag nach Verbrauch von insgesamt 1 mM Ethanol produziert (Abbildung 3.4 A).

CH_4 wurde sowohl in den Inkubationen mit Ethanol (8,1 $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$) als auch in den Kontrollen ohne Substrat (2 $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$) produziert (Abbildung 3.4 B). Eine sofortig anlaufende CH_4 -Bildung nach der Vorinkubation in den Inkubationen mit Ethanol zeigte (Abbildung 3.4 B), dass alle alternativen Elektronenakzeptoren neben CO_2 reduziert worden waren, und die Zugabe von Ethanol Methanogenese begünstigte (Abbildung 3.4 B). H_2 wurde nur in Inkubationen mit Ethanol vom 10. Tag

bis zum 20. Tag produziert und war bis zum Tag 25 verbraucht (Abbildung 3.4 C). H_2 wurde in unsupplementierten Kontrollen nicht detektiert (Abbildung 3.4 C).

In den Inkubationen mit Ethanol wurde Acetat bis zu $15,3 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ und in den Kontrollen bis zu $7,3 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ produziert (Abbildung 3.5 A und B). In den Inkubationen mit Ethanol wurden Butyrat- Konzentrationen von ca. $8 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ und in den Kontrollen von ca. $1,7 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ detektiert (Abbildung 3.5 A und B). Formiat blieb in den Inkubationen mit Ethanol relativ konstant (ca. $0,7 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$), während in den Kontrollen Formiat bis zu $2 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ akkumulierte (Abbildung 3.5 A und B).

Am 15. Tag der Inkubation mit Ethanol wurden 15% der Elektronen in Gärungsprodukten (Formiat und Propionat) und 6% in CH_4 wieder gefunden, am 20. Tag betrug die Elektronenwiederfindung im Gärungsprodukt Butyrat 117% und CH_4 ca. 5% (bei den Berechnungen wurden die Werte der unsupplementierten Kontrollen abgezogen). Die Beobachtung, dass ein Großteil an Elektronen im Gärungsprodukt Butyrat wieder gefunden wurde, deutet darauf hin, dass Gärung signifikant während des Elektronenflusses war.

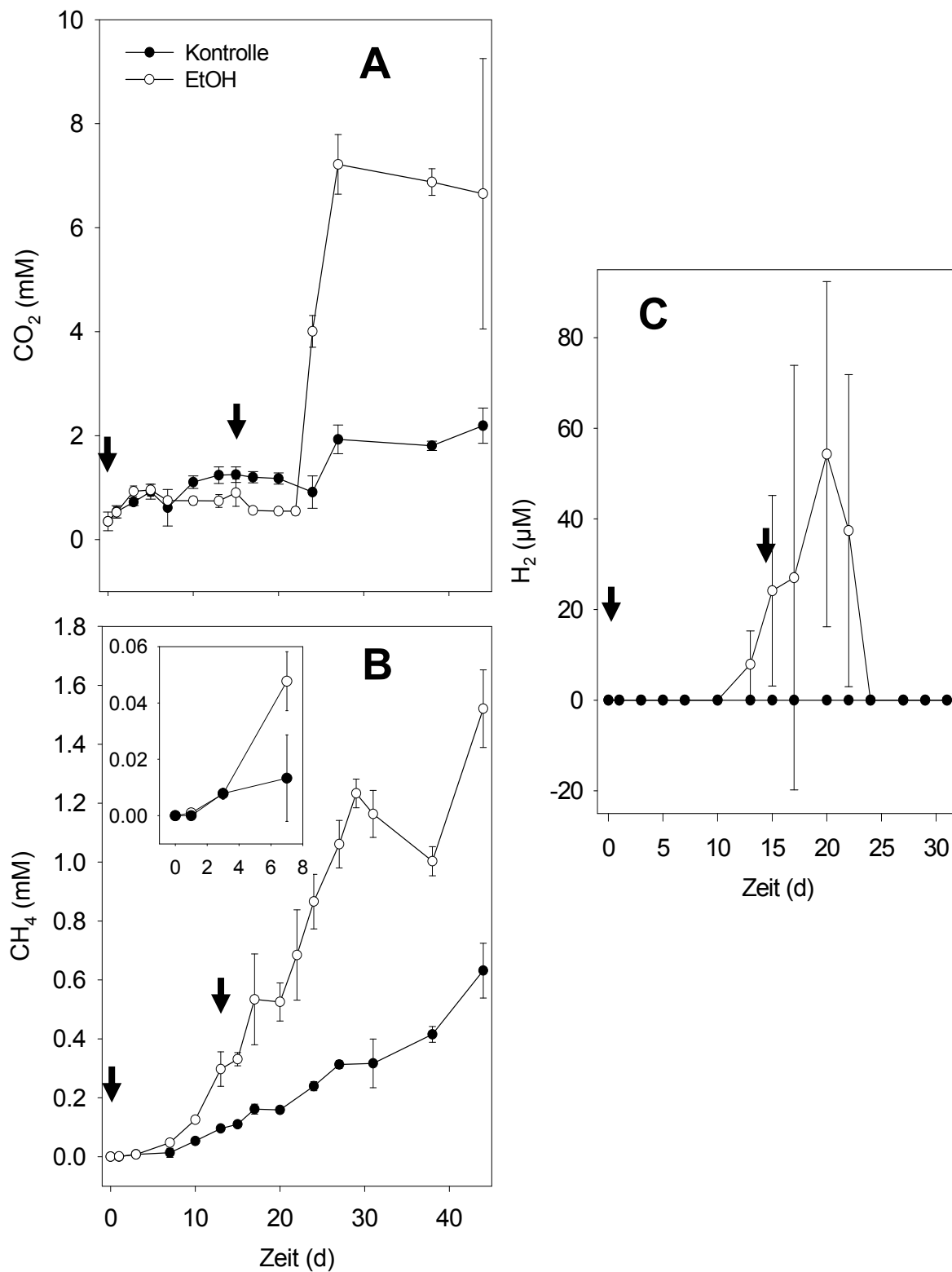


Abbildung 3.4: CO₂- (A), CH₄- (B) und H₂-(C) Konzentrationen in anoxischen Inkubationen mit Ethanol (○) und ohne Substrat (Kontrolle, ●) bei 15°C. In Abbildung B wurden die initialen CH₄-Konzentration vergrößert dargestellt. Pfeile markieren die Zugabe von ca. 0.5 mM Ethanol. Fehlerbalken sind Standardabweichungen ($n=3$).

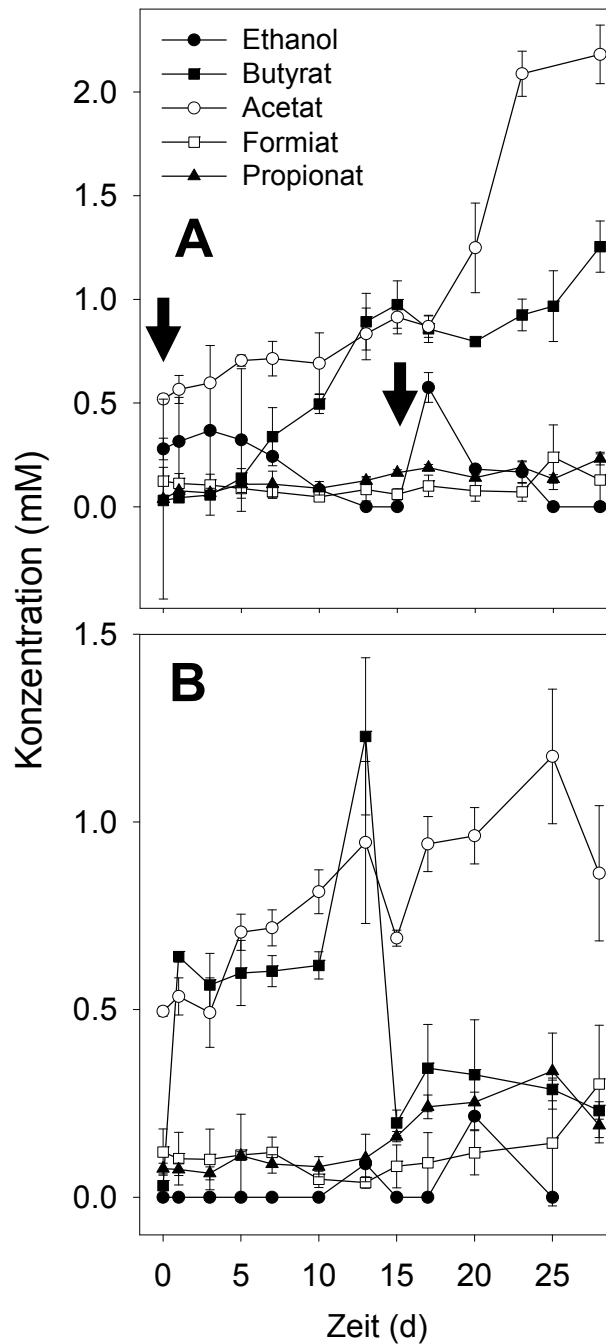


Abbildung 3.5: Die Produktion von organischen Säuren in Inkubationen mit Ethanol (A) und ohne Substrat (Kontrollen) bei 15°C (B). Pfeile in A markieren die Zugabe von ca. 0.5 mM Ethanol. Fehlerbalken sind Standardabweichungen ($n=3$).

3.2.3. Effekt von Xylose und Glucose auf den Kohlenstofffluss

Eine sofortige anlaufende Methanogenese nach der Vorinkubation in Raten von $16 \pm 0,009 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ in den unsupplementierten Kontrollen zeigte, dass alle alternativen Elektronenakzeptoren neben CO_2 reduziert worden waren, wodurch v. a. der Zuckerverbrauch von Fermentierern begünstigt wurde. 0,4 mM Xylose wurden anfangs innerhalb 5 Tagen und 0,4 mM Glucose innerhalb von 4 Tagen verbraucht (Abbildung 3.6 A1 und B1). Innerhalb von 14 Tagen betrug der kumulative Verbrauch von Xylose $18 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ und von Glucose $20 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$. Formiat akkumulierte vorübergehend bis auf $1,97 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ und wurde bis Tag 6 verbraucht. In Inkubationen mit Xylose oder Glucose akkumulierte Acetat bis zu $4,38 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ mit Xylose und bis zu $9,46 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ mit Glucose (Abbildung 3.6 A2 und B2). Butyrat akkumulierte bis zu $3,30 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ mit Xylose und bis zu $6,29 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ mit Glucose (Abbildung 3.6 A2 und B2), was auf Fermentation im Moor hinweist.

Ca. $40 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{CO}_2$ wurde in beiden Versuchsreihen produziert (Abbildung 3.6 A3 und B3). H_2 und CH_4 wurden sowohl mit Xylose ($4,0 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{H}_2$ und $1,56 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{CH}_4$) als auch mit Glucose ($3,61 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{H}_2$ und $1,20 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{CH}_4$) produziert (Abbildung 3.6 A3 und B3). H_2 wurde in unsupplementierten Bodenaufschlämmungen nicht detektiert (Daten nicht gezeigt).

Am 5. Tag der Inkubationen mit Xylose wurden 75% der Elektronen in Gärungsprodukten (Acetat, Butyrat, Formiat und CO_2 [27%]) und 1% in CH_4 wiedergefunden, am 12. Tag wurden ca. 89% der Elektronen in Gärungsprodukten (Acetat, Butyrat, Propionat und CO_2 [50%]) und 2% in CH_4 wiedergefunden. Am 3. Tag der Inkubation mit Glucose wurden 70% der Elektronen in Gärungsprodukten (Acetat, Butyrat, Propionat und CO_2 [37%]) und 0.4% in CH_4 wieder gefunden; am 12. Tag wurden ca. 98% der Elektronen in Gärungsprodukten (Acetat, Butyrat, Propionat und CO_2 [48%]) und 2% in CH_4 . Da der Großteil an Elektronen in Gärungsprodukten wieder gefunden wurde, war vermutlich Gärung signifikant während des Elektronenflusses.

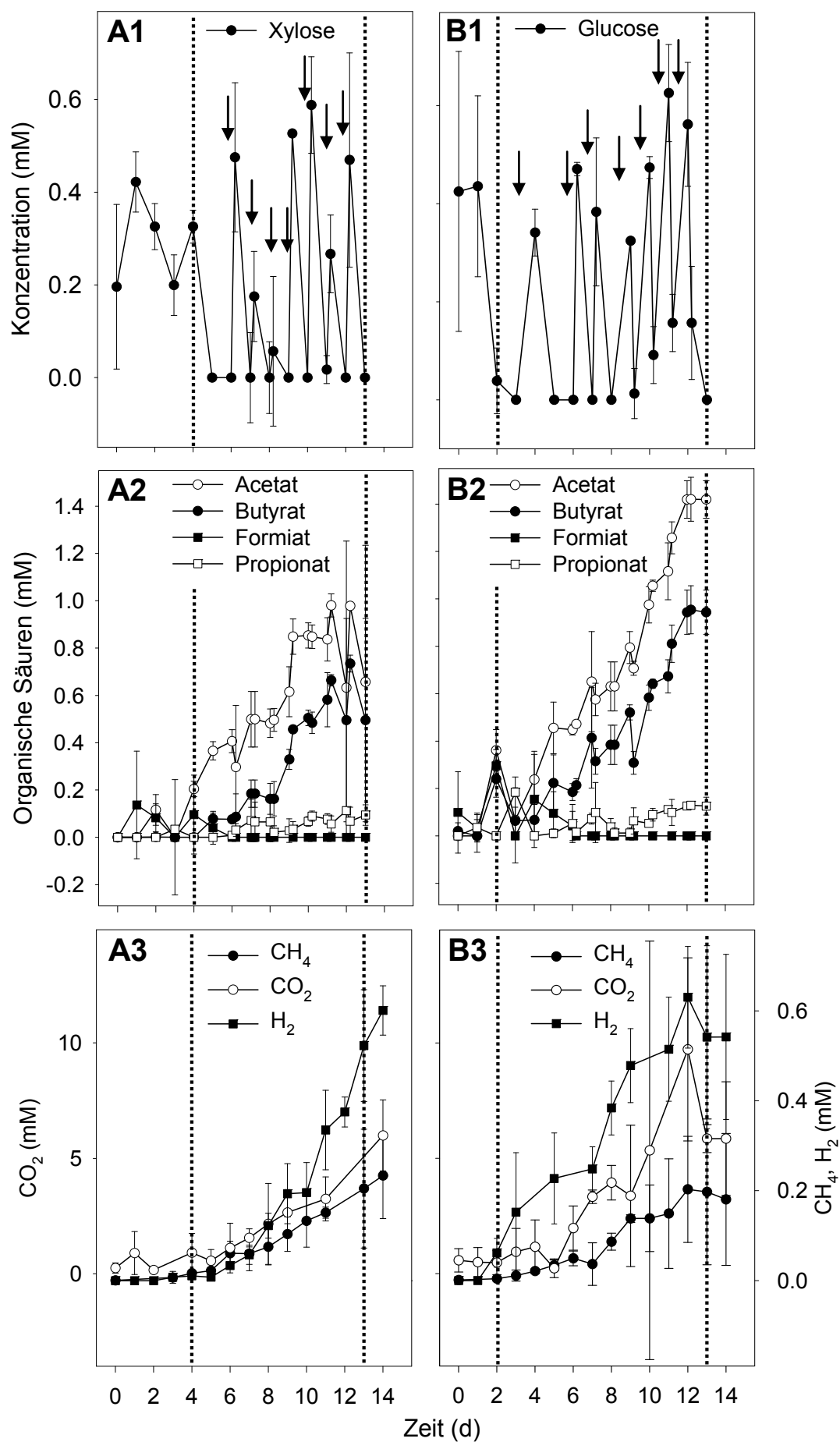


Abbildung 3.6: Einfluss von Xylose- (A1) und Glucose- (B1) Konzentrationen (Pfeile markieren die Zugabe von Substrat) auf die Produktion von organischen Säuren (A2, B2), CO₂, H₂, und CH₄ (A3, B3) in anoxischen Bodenaufschlämmungen ($n=3$). Kontrollen waren unsupplementierte anoxische Bodenaufschlämmungen. Die Daten der Kontrollen wurden von den Daten der supplementierten Bodenaufschlämmungen abgezogen. Gepunktete Linien markieren den frühen und späten Probenahmezeitpunkt für RNA-Gradienten.

3.3. Identifikation von ¹³C-markierter Mikrobiota

Es wurden zu Tag 4 und 13 der ¹³C-Xylose-Inkubation und zu Tag 2 und 13 der ¹³C-Glucose-Inkubation Bodenproben entnommen (Abbildung 3.6; gestrichelte Linien) um die ¹³C-markierte RNA der Bodenmikrobiota zu identifizieren. Die Bodenproben des ¹³C-Ethanol-Experiments wurden zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert (nicht im Rahmen dieser Arbeit). Die RNA Extraktion aus den Bodenproben des Xylose- und Glucose-Experiments (2.9.1.) war überall erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

3.3.1. Analyse der ¹²C- und ¹³C-angereicherten Fraktionen

Isopyknische Zentrifugation wurde erfolgreich mit extrahierter RNA der Xylose- und Glucose-Inkubationen nach 2, 4 und 13 Tagen durchgeführt, um „schwere“ ¹³C- und „leichte“ ¹²C-RNA zu trennen (2.9.3.). Die Dichte aller Fraktionen (1-12) folgte einem linearen Gradienten von 1,84 – 1,76 g ml⁻¹, was darauf hindeutete, dass die isopyknische Zentrifugation erfolgreich war. Die Dichte von Fraktion 4-5 („schwere“) und 10 („leichte“) betrugen 1,816 – 1,81 g ml⁻¹ und 1,768 g ml⁻¹, was darauf hindeutete, dass diese Fraktionen ¹³C- und ¹²C-RNA besaßen (Lüders et al., 2004).

Die RNA der Fraktionen 4-11 der ¹³C-Xylose- und ¹³C-Glucose-Inkubationen zu Tag 2, 4 und 13 wurde nach Präzipitierung aus der Gradientenlösung (2.9.5.) erfolgreich mit „Random Hexameren“ in unspezifische cDNA (Daten nicht gezeigt) umgeschrieben. cDNA wurde erfolgreich mit *Bacteria*- oder *Archaea*- spezifischen Primern amplifiziert (Abbildung 3.7). Zur Überprüfung ob die Fraktionierung erfolgreich war, wurden die Proben mittels DGGE analysiert.

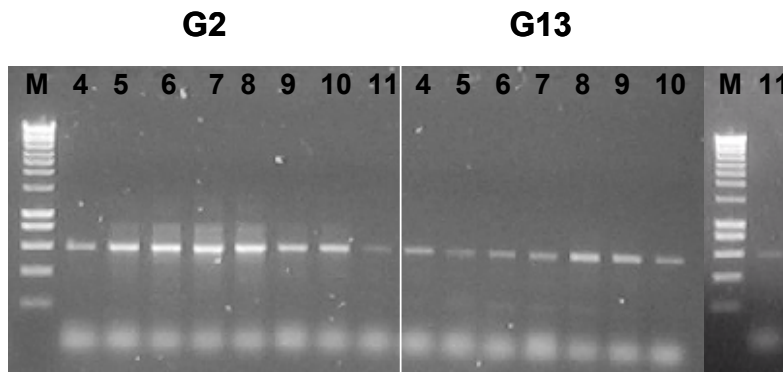


Abbildung 3.7: 1% Agarosegel mit amplifizierten *Bacteria* -16S rRNA Genen der Fraktionen 4-11 der Inkubation mit Glucose zu Tag 2 (G2) und 13 (G13) für DGGE-Analyse. M, Längenstandard MWM1 (2.9.8.1.).

DGGE Profile der Xylose- und Glucose- Inkubationen zum frühen Probenahmezeitpunkt (Tag 2 und 4) und zum späten Probenahmezeitpunkt (Tag 13) von Fraktion 4-5 waren signifikant unterschiedlich von Fraktion 6-11 (Abbildung 3.8 A und B, 3.9 A und B). Diese Beobachtung zeigte, dass die *Bacteria*- 16S rRNA Gene der „schweren“ Fraktionen von der der „leichten“ Fraktionen getrennt worden war. Somit war offensichtlich, dass ausreichend ^{13}C während der Inkubation in die RNA eingebaut worden war.

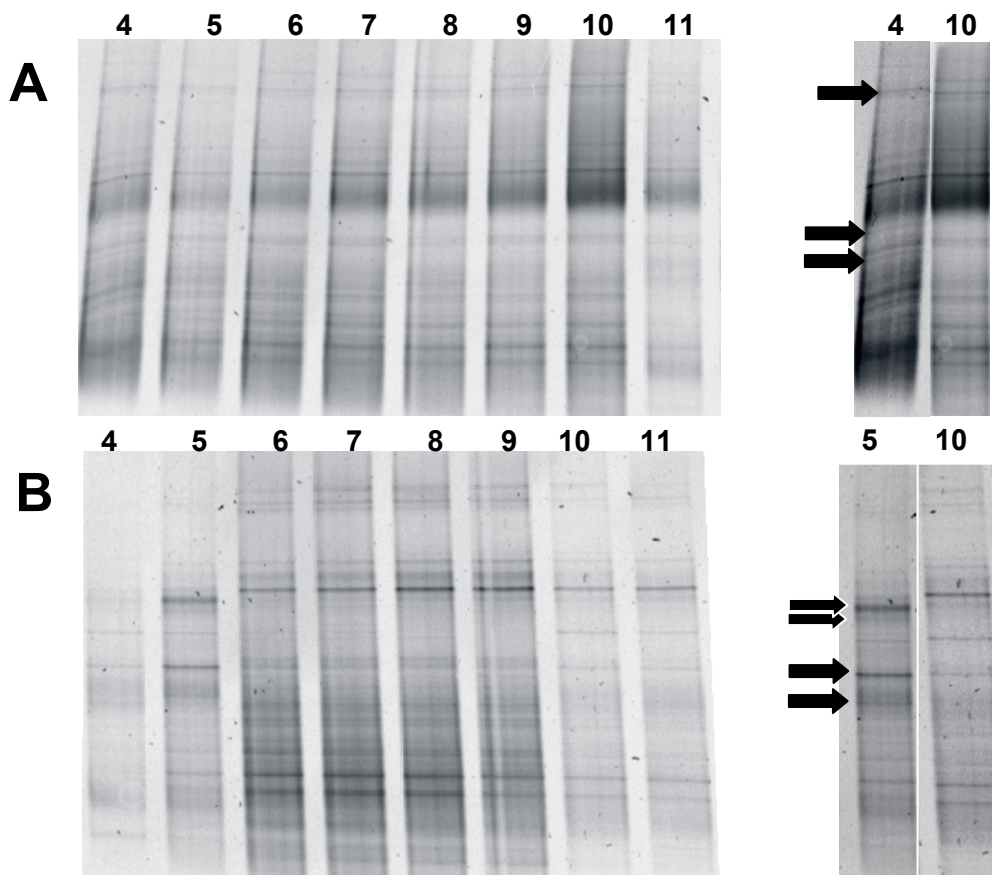


Abbildung 3.8: DGGE-Profile von amplifizierten *Bacteria*-16S rRNA Genen der Fraktionen 4 – 11 der Xylose-Inkubation am Tag 4 (A) und 13 (B). Gegenüberstellung der „schweren“ (4 bzw. 5) und „leichten“ Fraktion (10). Pfeile markieren Banden, die in der „schweren“ aber nicht oder nur schwach in der „leichten“ Fraktion vorkommen.

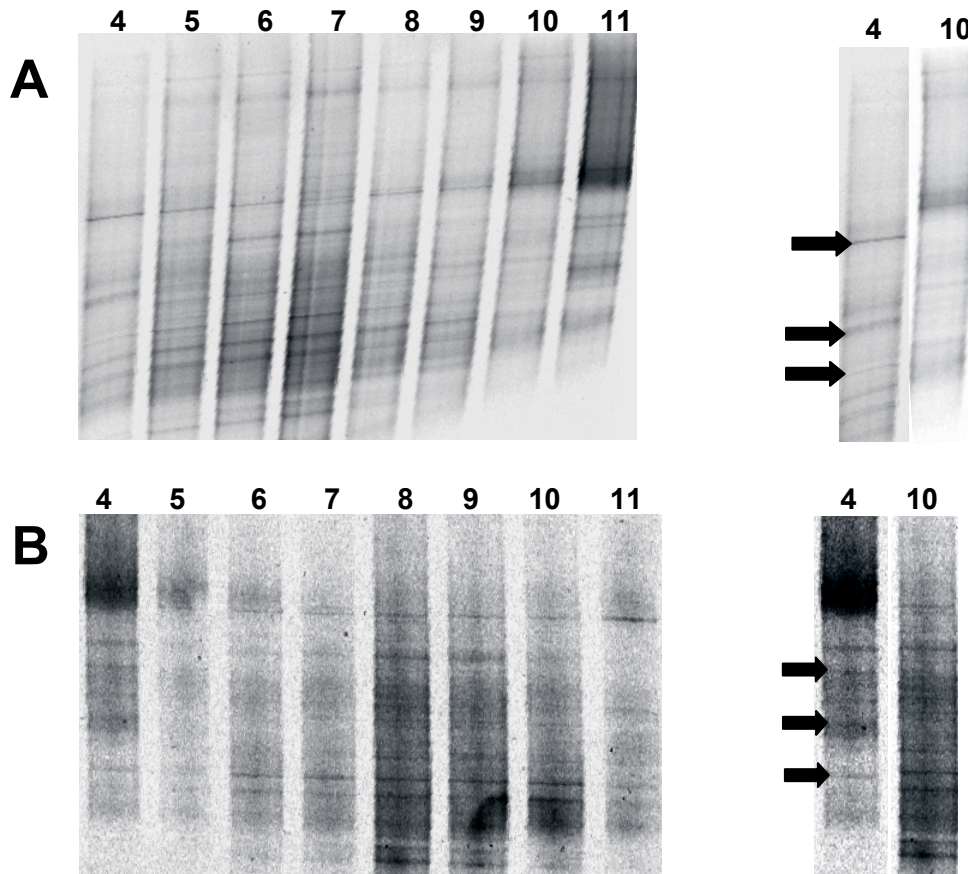


Abbildung 3.9: DGGE-Profile der amplifizierten *Bacteria*-16S rRNA Gene der Fraktionen 4 – 11 der Glucose-Inkubation am Tag 2 (A) und 13 (B). Gegenüberstellung der „schweren“ (4) und „leichten“ Fraktion (10). Pfeile markieren Banden, die in der „schweren“ aber nicht in der „leichten“ Fraktion vorkommen.

Archaeen- DGGE-Profile der „leichten“ Fraktionen (6-11) aus der Xylose-Inkubation zum frühen und späten Probenahmezeitpunkt zeigten kein einheitliches Muster (Abbildung 3.10 A und B). Aus der „schweren“ Fraktion 4 erhielt man zu wenig RNA, um ein eindeutiges Profil erkennen zu können. Im DGGE Profil der „schweren“ Fraktion 5 konnten nur Banden detektiert werden, die auch in den „leichten“ Fraktionen auftraten (Abbildung 3.10 A), was darauf hindeutet, dass noch kein Einbau von ^{13}C in die 16S rRNA Gene der Archaeen stattgefunden hatte. Auch zum späten Probenahmezeitpunkt wurden in der „schweren“ Fraktion 5 nur Banden

detektiert, die auch in den „leichten“ Fraktionen vorkamen, was darauf hindeutet, dass wenig ^{13}C - Substrat verwertet oder keine eindeutige Trennung der ^{13}C -angereicherten RNA stattgefunden hatte. Die erstellten DGGE-Profile mit amplifizierten *Archaea*-16S rRNA Genen aus der Inkubation mit Glucose zeigten mehrmals sehr diffuse Bandenmuster, die sehr schwach auf dem DGGE-Gel zu erkennen waren, was vermuten lässt, dass generell die extrahierte RNA Konzentration für die Analyse zu gering war (Daten nicht gezeigt).

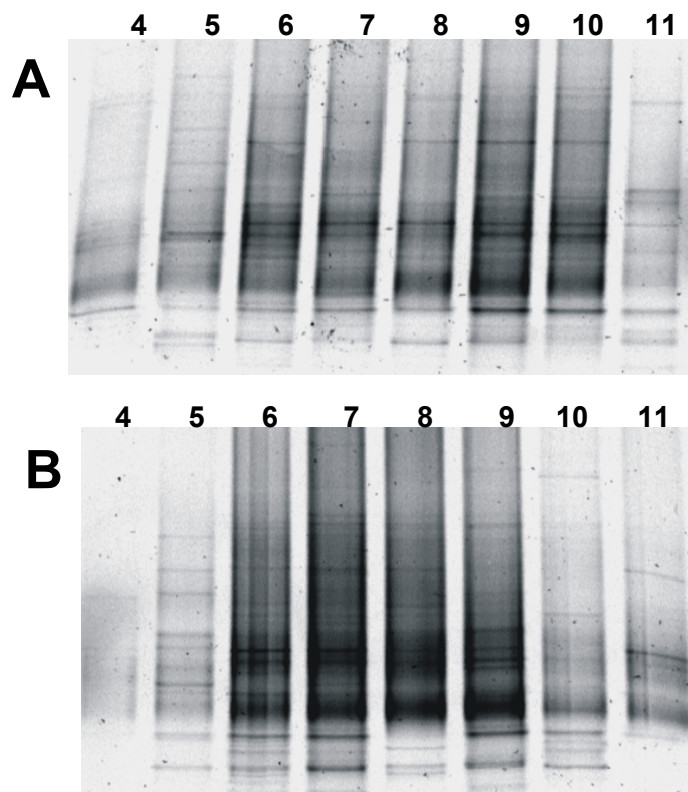


Abbildung 3.10: DGGE Profile von amplifizierten *Archaea*-16S rRNA Genen der Fraktionen 4-11 der Xylose-Inkubation am Tag 4 (A) und 13 (B).

3.3.2. Phylogenetische Analyse aktiver prokaryotischer Populationen

Nach Klonierung der amplifizierten *Bacteria*-16S rRNA Gene der „schweren“ Fraktion 4 der Xylose- und Glucose-Inkubation zum frühen und späten Probenahmezeitpunkt (Abbildung 3.11) und Klon-Screening, wurden die Genbibliotheken mit Hilfe des Rarefaction Programms analysiert.

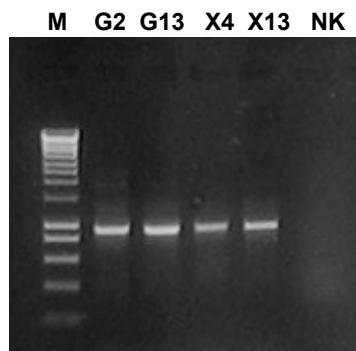


Abbildung 3.11: 1% Agarosegel mit bakterienspezifischen Primern 27F/907R amplifizierte cDNA von Fraktion 4 der Glucose (G)- und Xylose (X)-Inkubation zu den Probenahmezeitpunkten Tag 2, 4, und 13. M, Längenstandard MWM1 (2.9.8.1.); NK, Negativ-Kontrolle.

16S rRNA Genbibliotheken der „schweren“ RNA-Fraktionen des Xylose-Experiments zu Tag 4 und 13 und des Glucose-Experiments zu Tag 2 und 13 wurden erstellt, um die Phylogenie von anaeroben Xylose- und Glucose-abbauenden Mikroorganismen zu identifizieren. Insgesamt wurden 190 Klone mittels RFLP überprüft. Coverages der Genbibliotheken, die durch RFLP-Analyse bestimmt wurden, reichten von 86% bis 96% (Abbildung 3.12). 14 unterschiedliche RFLP-Muster (operational taxonomic units, OTUs) wurden in den „schweren“ Fraktionen detektiert, die aus den Xylose- und Glucose-Experiments zum frühen Probenahmezeitpunkt stammten. 10 unterschiedliche OTUs wurden aus der „schweren“ RNA des Xylose-Experiments und 6 OTUs aus dem Glucose-Experiment jeweils am 13. Tag ermittelt (Abbildung 3.12). Diese 16S rRNA Gensequenzen wurden den *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, *Deltaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, und *Clostridia* (Abbildung 3.14) zugeordnet, was darauf hindeutet, dass phylogenetisch diverse Bakterien Xylose und Glucose im gemäßigt sauren Moorbodenaufschlammungen metabolisierten.

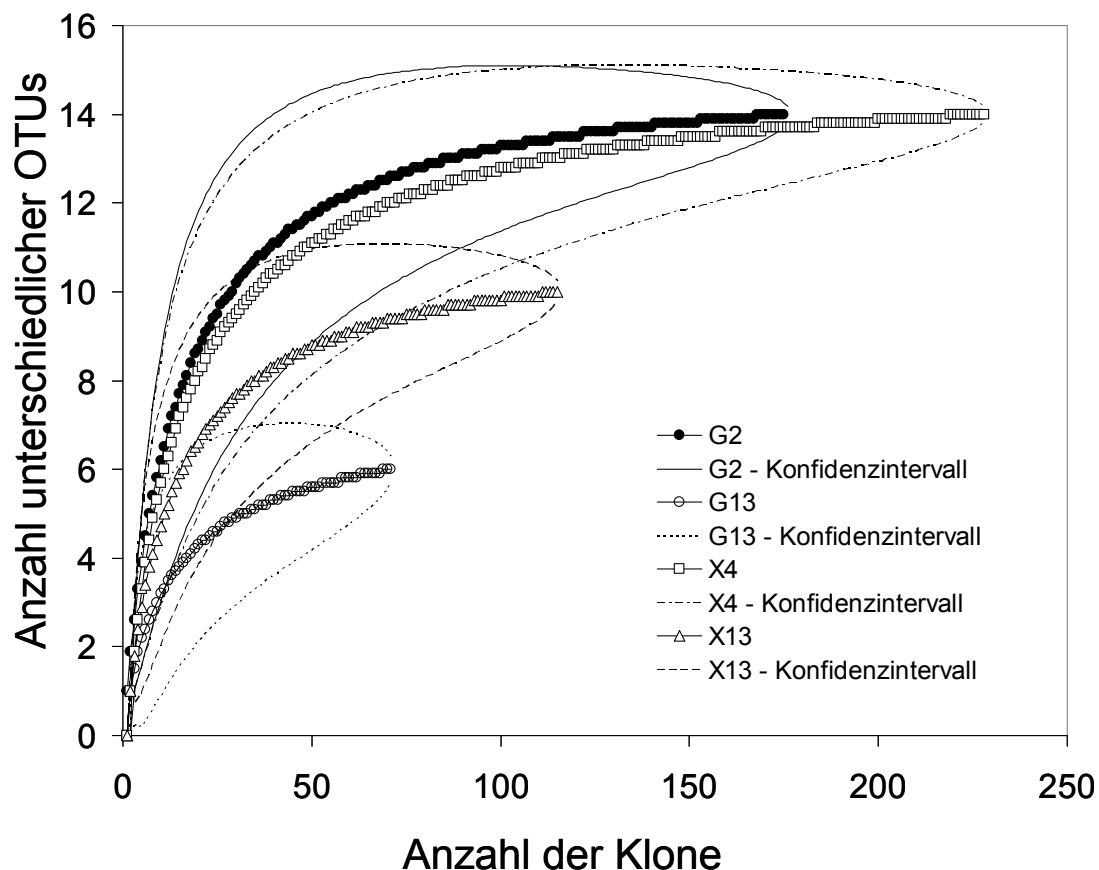


Abbildung 3.12: Rarefaction Analyse der Genbibliotheken von „schwerer“ RNA aus den Xylose- Inkubationen zu Tag 4 und 13 (X4 und X13) und aus den Glucose- Inkubationen zu Tag 2 und 13 (G2 und G13).

T-RFLP Analyse mit „schweren“ *Bacteria*- 16S rRNA Genen aus Fraktion 4, die aus den Inkubationen mit ^{13}C -Xylose und ^{13}C -Glucose zum frühen und späten Probenahmezeitpunkt stammten, zeigten bis zu 31 T-RFs (Terminale Restriktionsfragmente, Abbildung 3.13), was darauf hindeutet, dass (i) diverse Mikroorganismen das markierte Substrat metabolisiert haben, und (ii) genug ^{13}C in RNA zum frühen Probenahmezeitpunkt eingebaut war. Im ^{13}C -Xylose Experiment besaßen 18 T-RFs (116, 140, 150, 166, 170, 190, 266, 326, 420, 440, 454, 468, 492, 496, 520, 544, 562 und 592 bp; diese T-RFs beziehen sich auf solche, die am Tag 4 und/oder 13 detektiert wurden) in T-RFLP Profilen der schweren Fraktion eine höhere relative Abundanz als in T-RFLP Profilen der leichten Fraktion (Abbildung 3.13). 11 dieser T-RFs (116, 140, 150, 166, 190, 266, 468, 492, 520, 544 und 592 bp) kamen an den Tagen 4 und 13 vor. Die relative Abundanz drei dieser T-RFs (166, 266 und 440 bp) nahm bis zum Tag 13 zu. Im ^{13}C -Glucose Experiment

besaßen 15 T-RFs (126, 140, 150, 158, 170, 190, 224, 326, 400, 420, 468, 496, 520, 544 und 562 bp; diese T-RFs beziehen sich auf solche, die an den Tagen 2 und/oder 13) in T-RFLP Profilen der schweren Fraktion eine höhere relative Abundanz als in T-RFLP Profilen der leichten Fraktion (Abbildung 3.13). 5 dieser T-RFs (158, 326, 420, 468 und 562 bp) kamen an den Tagen 2 und 13 vor, wobei die relative Abundanz 3 dieser T-RFs (140, 290 und 496 bp) bis zu Tag 13 zunahm.

Ein Teil der T-RFs des ^{13}C -Xylose-Experiments konnte zu klonierten 16S rRNA Genen zugeordnet werden, die entweder aus Fraktion 4 oder von direkter 16S rRNA Genanalyse stammten (Tabelle 3.4; Abbildung 3.14). T-RFs, die indikativ für *Acidobacteriaceae* (96 und 116 bp), *Acidothermaceae* (140 bp), *Sphingomonadaceae* und *Aeromonadaceae* (beide 150 bp), *Pseudomonadaceae* (492 bp), *Enterobacteriaceae* und *Aeromonadaceae* (beide 496 bp), sowie *Clostridiaceae* (520 bp) waren, wurden in der „schweren“ Fraktion zum frühen Probenahmezeitpunkt identifiziert (Abbildung 3.13). Diese T-RFs hatten eine niedrigere relative Abundanz zum späten Probenahmezeitpunkt (Abbildung 3.13). T-RFs, die indikativ für *Syntrophobacteraceae*, *Rhodobiaceae* (beide 166 bp) und *Acidobacteriaceae* (266 bp) waren, besaßen am 13. Tag eine höhere relative Abundanz als am Tag 4 (Abbildung 3.13). Das 440 bp T-RF war indikativ für *Rhodospirillaceae* und *Chlorobiaceae* und kam nur am Tag 13 vor (Abbildung 3.13). T-RFs aus dem ^{13}C -Glucose-Experiment, wurden *Sphingomonadaceae* und *Aeromonadaceae* (beide 150 bp) und *Clostridia* (520 bp) zugeordnet. Die relative Abundanz dieser T-RFs war bereits nach 2 Tagen in der „schweren“ Fraktion höher als in der „leichten“ (Abbildung 3.13), was darauf hindeutet, dass Mitglieder dieser phylogenetischen Gruppen ^{13}C -Glucose während der initialen Inkubationsperiode konsumiert hatten. Die relative Abundanz dieser T-RFs nahm während der Inkubation ab (Abbildung 3.13). Die relativen Abundanzen von T-RFs, die indikativ für *Enterobacteriaceae* und *Aeromonadaceae* (beide 496 bp) waren, nahmen vom 2. Tag bis zum 13. Tag zu. Das T-RF, das indikativ für *Acidaminococcaceae* (290 bp) war, kam nur am Tag 13 vor (Abbildung 3.13).

Tabelle 3.4: Detektierte T-RFs, ihre repräsentativen Klone und ihre Ähnlichkeit zu der nächsten Sequenz und der nächsten kultivierten Art.

Zuordnung der Sequenzen ^a (Registrierungsnummer; Anzahl der Sequenzen)	Nächste verwandte Sequenz (Registrierungs- nummer)	Ähn- lich- keit (%)	Nächster kultivierter Verwandter (Registrierungs- nummer)	Ähn- lich- keit (%)	T- RF (bp)
<i>Alphaproteobacteria</i>					
<i>Sphingomonadaceae</i>					
X4A5 (AM712585; 2)	<i>Sphingomonas</i> sp. (AF385529)	92	<i>Sphingomonas</i> <i>echinoides</i> (AJ012461)	95	150
<i>Rhodobiaceae</i>					
B2-16 (AM773982; 3)	Uncultured bacterium (AJ583166)	95	<i>Roseospirillum parvum</i> (AJ011919)	90	166
<i>Rhodospirillaceae</i>					
B2-8 (AM773974)	Uncultured bacterium (AJ295647)	96	<i>Skermanella parooense</i> (X90760)	90	440
<i>Deltaproteobacteria</i>					
<i>Syntrophobacteraceae</i>					
B1-92 (AM773964)	Uncultured bacterium (AJ306805)	97	<i>Syntrophobacter wolinii</i> (X70905)	96	166
<i>Gammaproteobacteria</i>					
<i>Enterobacteriaceae</i>					
X13A3 (AM712574; 2)	<i>Shigella sonnei</i> (X80726)	>99	<i>Shigella flexneri</i> (X96963)	>99	496
<i>Aeromonadaceae</i>					
G2A6 (AM712567)	Bacterium H4 (AY345546)	99	<i>Tolomonas auensis</i> (X92889)	98	496
G2A13 (AM712565)	Uncultured bacterium (AJ318149)	92	<i>Tolomonas auensis</i> (X92889)	93	150
<i>Pseudomonadaceae</i>					
X13A11 (AM712542; 2)	<i>Pseudomonas</i> sp. (AF098466)	100	<i>Pseudomonas putida</i> (AJ308312)	99	492
<i>Actinobacteria</i>					
<i>Acidothermaceae</i>					
X4A11 (AM712581)	Uncultured actinomycete (Z73383)	94	<i>Acidothermus</i> <i>cellulolyticus</i> (X70635)	90	140
<i>Acidobacteria</i>					
<i>Acidobacteriaceae</i>					
X4A10 (AM712580; 16)	Uncultured bacterium (AY043842)	93	<i>Acidobacterium</i> <i>capsulatum</i> (D26171)	92	96
B1-69 (AM773947)	Uncultured bacterium (AJ000986)	94	<i>Acidobacterium</i> <i>capsulatum</i> (D26171)	93	116
B2-33 (AM773995; 2)	Uncultured bacterium (AF523892)	97	<i>Acidobacterium</i> <i>capsulatum</i> (D26171)	94	266
<i>Sphingobacteria</i>					
<i>Flexibacteraceae</i>					
B1-26 (AM773619)	Uncultured bacterium (AY218620)	85	<i>Flexibacter canadensis</i> (M62793)	86	166
<i>Clostridia</i>					
<i>Clostridiaceae</i>					
G13A6 (AM712563; 5)	Uncultured bacterium (AY212768)	>99	<i>Clostridium puniceum</i> (X71857)	>99	520
<i>Acidaminococcaceae</i>					
G13A4 (AM712561; 2)	Uncultured bacterium (AY524568)	95	<i>Acetonema longum</i> (M61919)	89	290
<i>Chlorobia</i>					
<i>Chlorobiaceae</i>					
B1-60 (AM773938)	Uncultured bacterium (AF445728)	89	<i>Chlorobium limicola</i> (Y101640)	78	440

^a Sequenzlänge von 700-900 bp

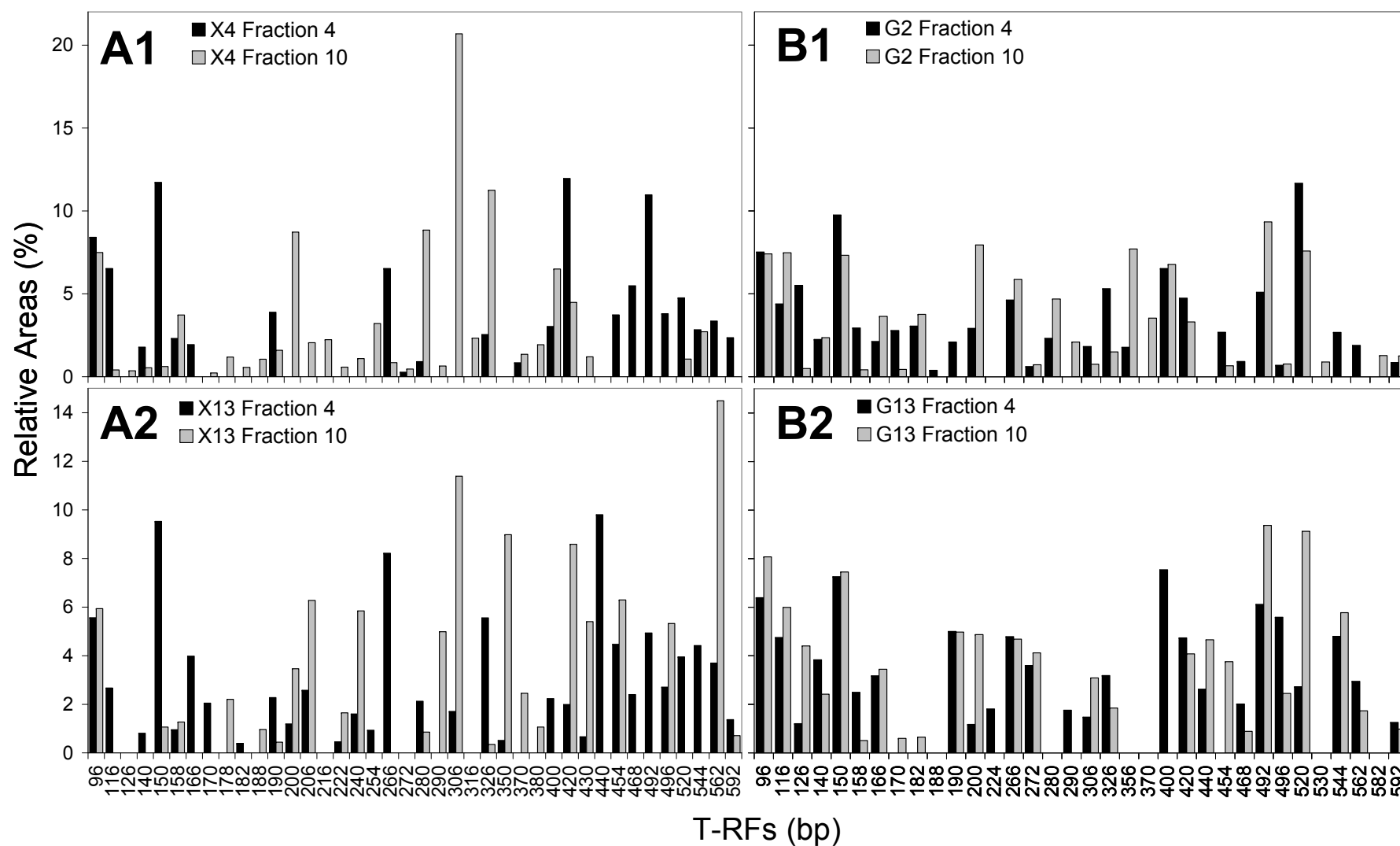
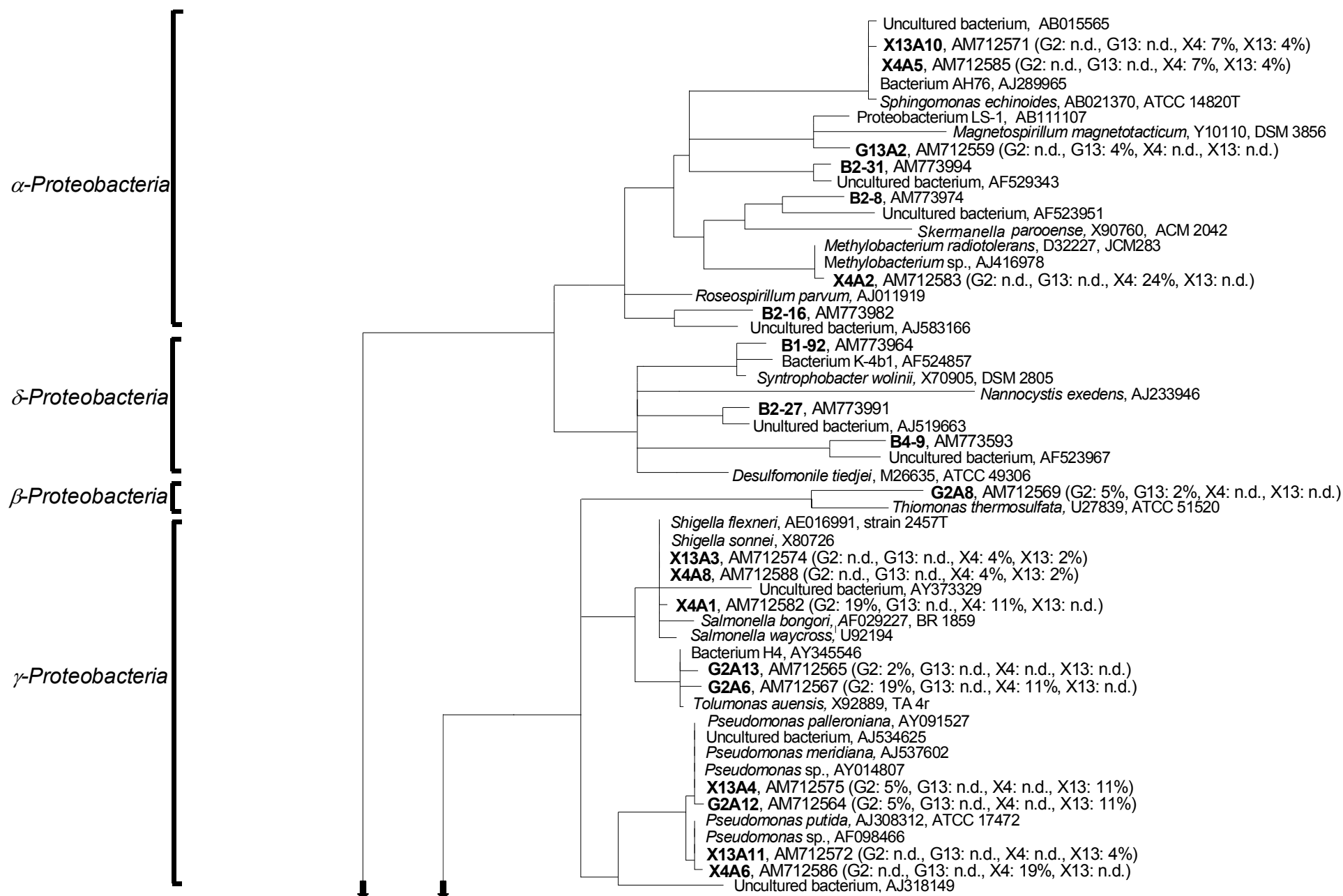


Abbildung 3.13: T-RFLP Profile von amplifizierten *Bacteria*-16S rRNA Genen der „schweren“ Fraktion 4 und der „leichten“ Fraktion 10 aus dem ^{13}C -Xylose-Experiment (A) oder dem ^{13}C -Glucose-Experiment (B) zu Tag 2 (A1), 4 (B1) und 13 (A2, B2).



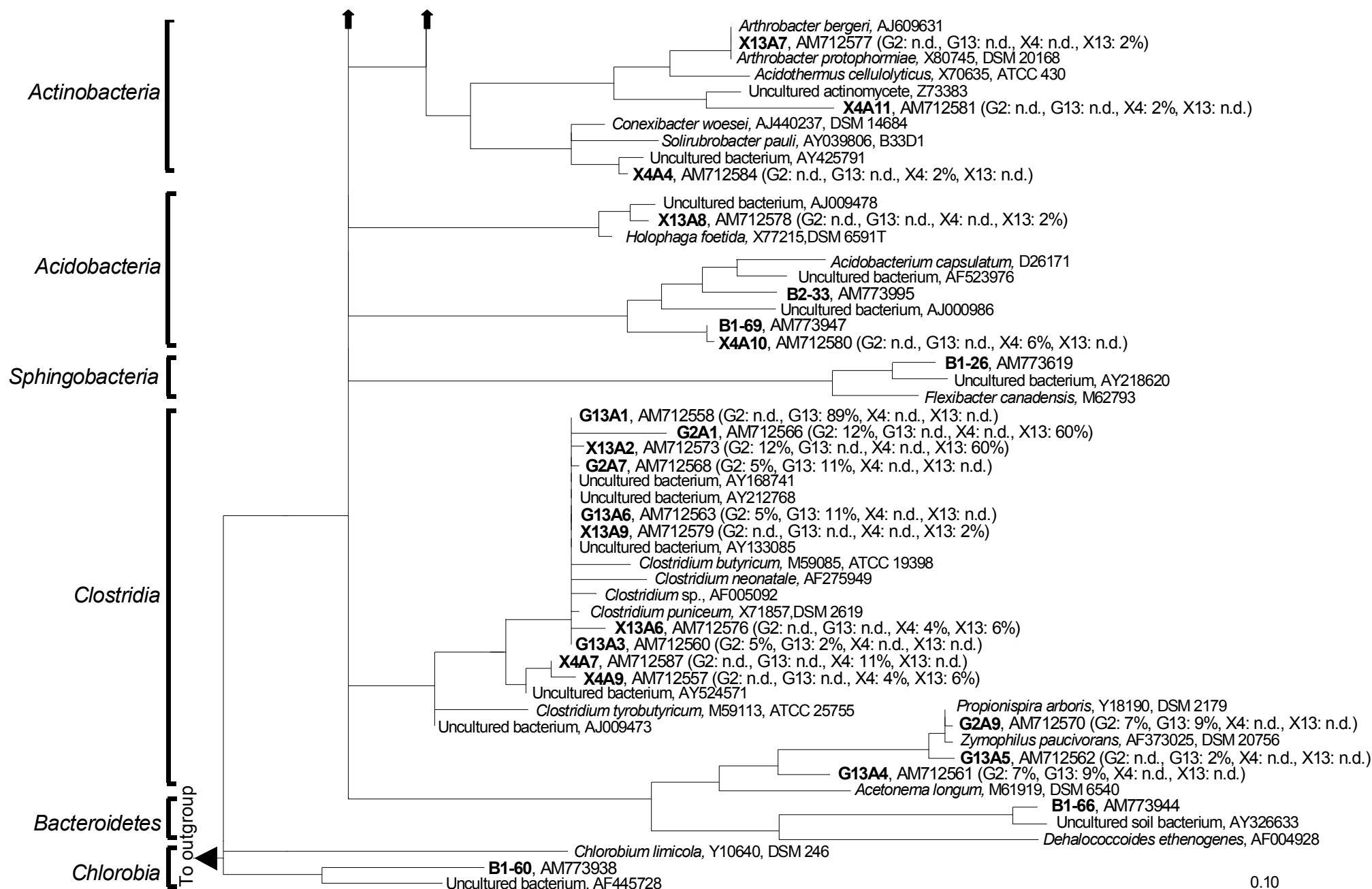


Abbildung 3.14: Phylogenetischer Konsensusbaum von *Bacteria*-16S rRNA Sequenzen (fett markiert), die in den „schweren“ Fraktionen des ^{13}C -Xylose- und Glucose-Experiments zum frühen und späten Probenahmezeitpunkt detektiert wurden. Registrierungsnummern sind nach den Sequenznamen angegeben, und relative Abundanzen (%) der OTUs in Genbibliotheken sind in Klammern angegeben. Blockpfeile deuten die Weiterführung der Äste auf der folgenden Seite an. Kodierungen: X4 und X13, Sequenzen aus den „schweren“ Fraktionen jeweils zu Tag 4 und 13 des ^{13}C -Xylose Experiments; G2 und G13, Sequenzen aus den „schweren“ Fraktionen jeweils zu Tag 2 und 13 des ^{13}C -Glucose Experiments; B, Sequenzen aus der direkten 16S rRNA Genanalyse des Moorbodens; n. d., nicht detektiert. Der gezeichnete Maßstab repräsentiert 10% Sequenzunterschied. Die Randgruppe (outgroup) ist *Thermocrinis albus* (AJ278895).

Eine *Archaea*-16S rRNA Genbibliothek wurde von RNA Präparationen nach 13 Tagen Inkubation erstellt, um potentiell aktive *Archaea* zu identifizieren. 16 Klone wurden mittels RFLP überprüft und 6 repräsentative Klone wurden sequenziert (Abbildung 3.15). Die detektierten 16S rRNA Gensequenzen wurden 16S rRNA Gensequenzen von *Methanobacterium subterraneum* (X99044, 95% Sequenzähnlichkeit), *Methanosarcina thermophila* (M59140, 98% Sequenzähnlichkeit), *Methanosarcina barkeri* (AJ012094, 97% Sequenzähnlichkeit), und *Crenarchaeota* Gruppe I.3 (94 - 99% Sequenzähnlichkeit; Abbildung 3.15) zugeordnet.

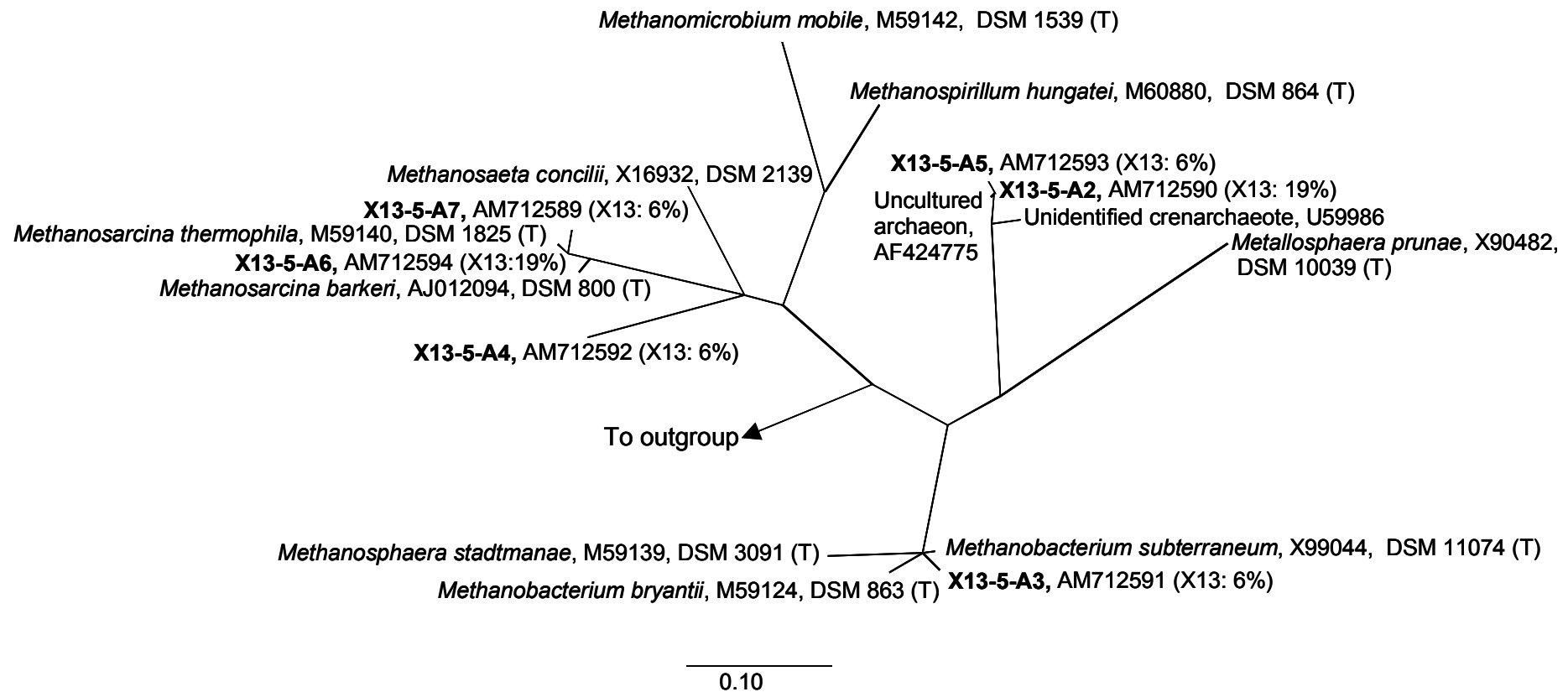


Abbildung 3.15: Phylogenetischer Konsensusbaum von *Archaea*-16S rRNA Gensequenzen vom Tag 13 des ^{13}C -Xylose Experiments (fett markiert). Registrierungsnummern sind nach der Sequenzidentifikation angegeben und relative Abundanzen (%) von OTUs der Genbibliothek X13 sind in Klammern angegeben. Der gezeichnete Maßstab repräsentiert 10% Sequenzunterschied. Die Randgruppe (outgroup) ist *Thermoplasma acidophilum* (M20822).

3.4. Distribution und Identifikation der mikrobiellen Gemeinschaft im Niedermoor

3.4.1. Abschätzung der mikrobiellen Heterogenität im Niedermoor

DNA wurde erfolgreich aus Moorboden den Manipulationsflächen A4-A6 und den Kontrollflächen K4-K6, sowie von jeder dieser Flächen aus den Tiefen 0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm und 30-40 cm extrahiert (Abbildung 3.16). Es wurden DGGE-Profile erstellt, um die mikrobielle Heterogenität der Flächen und Tiefen abschätzen zu können (Abbildung 3.17 A und B). Die Profile der *Bacteria*- 16S rRNA Gene waren einheitlicher als die Profile der *Archaea*- 16S rRNA Gene, was darauf hindeutet, dass die Bakterien-Populationen eine geringere räumliche Heterogenität zeigen als die Archaeen-Populationen. Zudem wurden pro *Bacteria*-DGGE-Profil mehr Banden detektiert als pro *Archaea*-DGGE-Profil, was darauf hindeutet, dass die Diversität der *Bacteria* höher ist als die der *Archaea*. Zur genaueren Analyse wurde eine 1/0 Distanzmatrix erstellt (Daten nicht gezeigt), wobei 1 das Vorhandensein einer Bande beschreibt und 0 keine Bande. Basierend auf diesen Distanzmatrices wurden Dendrogramme mit hierarchischer Clusteranalyse (2.11.3.) erstellt (Abbildung 3.18 A und B).

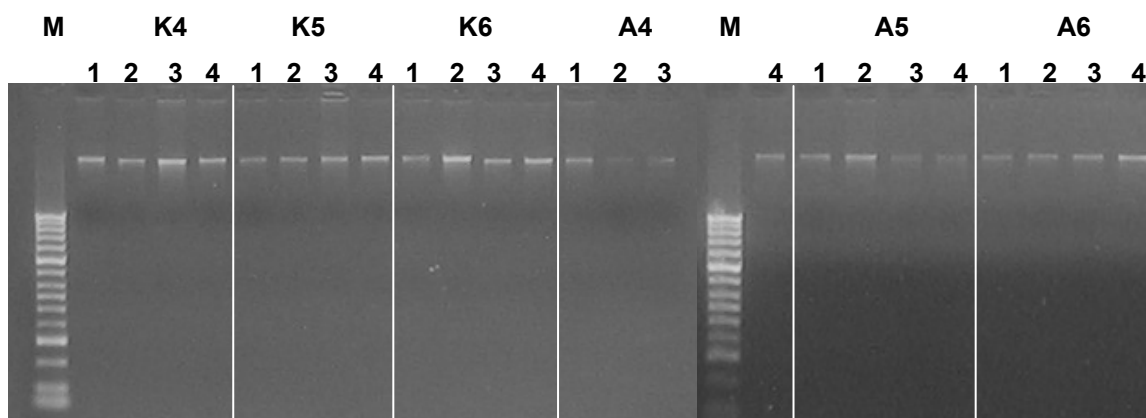


Abbildung 3.16: Ausschnitte eines 1% Agarosegels mit extrahierter DNA der Flächen K4-K6, A4-A6 und der Tiefen 0-10 (1), 10-20 (2), 20-30 (3) und 30-40 (4) cm. M, Marker MWM1 (2.9.8.1.).

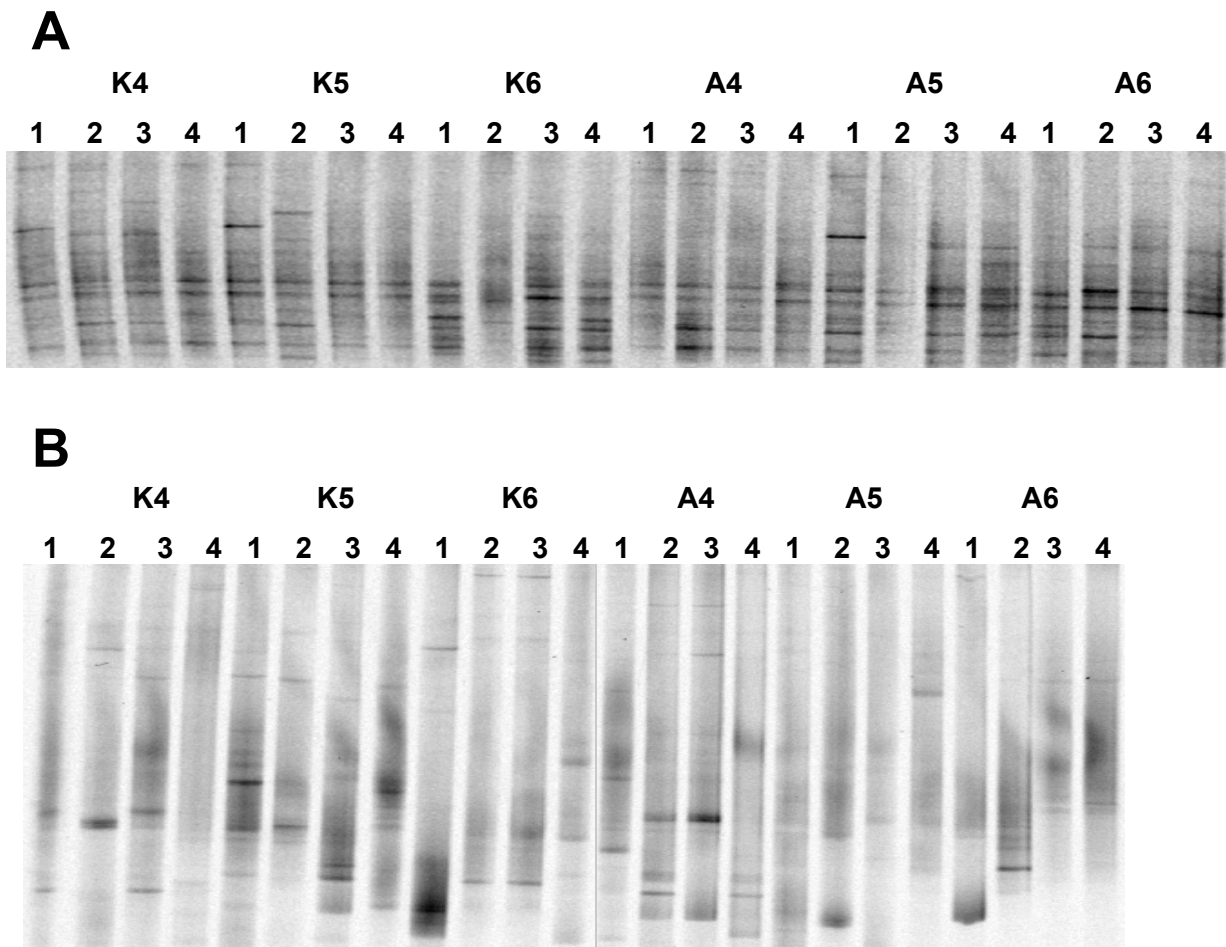


Abbildung 3.17: DGGE-Profil von amplifizierten *Bacteria*- (A) und *Archaea*- (B) 16S rRNA Genen der Kontrollflächen 4-6 (K4-6) und Manipulationsflächen 4-6 (A4-6) aus den Tiefen 0-10 cm (1), 10-20 cm (2), 20 -30 cm (3) und 30-40 cm (4).

Dendrogramme von DGGE-Profilen der *Bacteria*-16S rRNA Gene zeigten, dass die Profile unterschiedlicher Tiefen ähnlicher waren als diejenigen unterschiedlicher Probenahmestandorte (Abbildung 3.18 A), was darauf hindeutet, dass sich Bakterienpopulationen über die Tiefe ähnlich im Niedermoor verteilen und sich vor allem über die Fläche unterscheiden. Im Gegensatz dazu waren die *Archaea*- DGGE-Profile unterschiedlicher Probenahmestandorte ähnlicher als diejenigen von unterschiedlichen Tiefen (Abbildung 3.18 B), was darauf hindeutet, dass sich Archaeenpopulationen ähnlich über die Fläche verteilen und sich vor allem über die Tiefe unterscheiden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Bakterien und Archaeen Populationen im Moor räumlich heterogen sind.

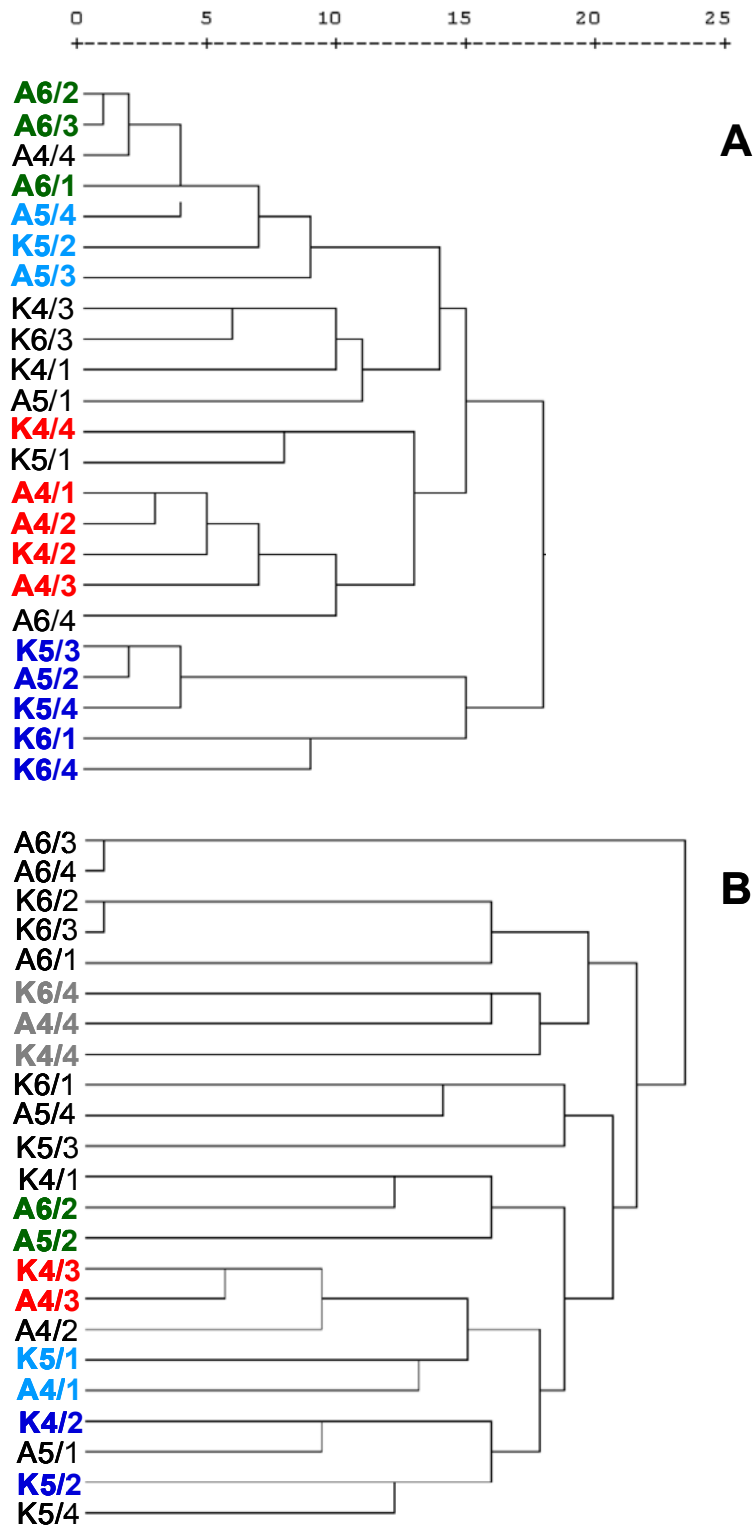


Abbildung 3.18: Dendrogramme von DGGE-Profilen mit amplifizierten *Bacteria*- (A) und *Archaea*- 16S rRNA Genen (B). Fette und farbige Markierung stellt unterschiedliche Cluster dar; Kodierung: K4-6, Kontrollflächen 4-6; A4-6, Manipulationsflächen 4-6; 1, Tiefe 0-10 cm; 2, Tiefe 10-20 cm; 3, Tiefe 20-30 cm, 4, Tiefe 30-40 cm.

3.4.2. Phylogenetische Analyse detektierter 16S rRNA Gene

293 Klone wurden positiv für *Bacteria*-16S rRNA Gene gewertet und 420 Klone positiv auf *Archaea*-16S rRNA Gene geprüft. Die Coverages der klonierten *Bacteria*-16S rRNA Gene betrug 92% und die der *Archaea*-16S rRNA Gene 99% (Abbildung 3.19 A). Es wurde eine größere Anzahl an unterschiedlichen OTUs von *Bacteria*-16S rRNA Genen (55 OTUs) detektiert als von *Archaea*-16S rRNA Genen (20 OTUs), was darauf hindeutet, dass es eine größere detektierbare Diversität innerhalb der Domäne *Bacteria* als innerhalb der *Archaea* im sauren Moor gibt (Abbildung 3.19 A). Rarefaction Analysen der Genbibliotheken unterschiedlicher Probenahmestandorte und Tiefen wurden erstellt und miteinander verglichen (Abbildung 3.19 B, C und Daten nicht gezeigt). Der Vergleich der Rarefaction Kurven 6 verschiedener Probenahmestandorte und 4 unterschiedlicher Tiefen (0-10, 10-20, 20-30 und 30-40 cm) zeigte, dass sich die 99%-Konfidenzintervalle hauptsächlich überlappten und nicht signifikant unterschiedlich waren (Abbildung 3.19 B und C), was darauf hindeutet, dass die Diversität der *Bacteria* und *Archaea* räumlich homogen sein könnte.

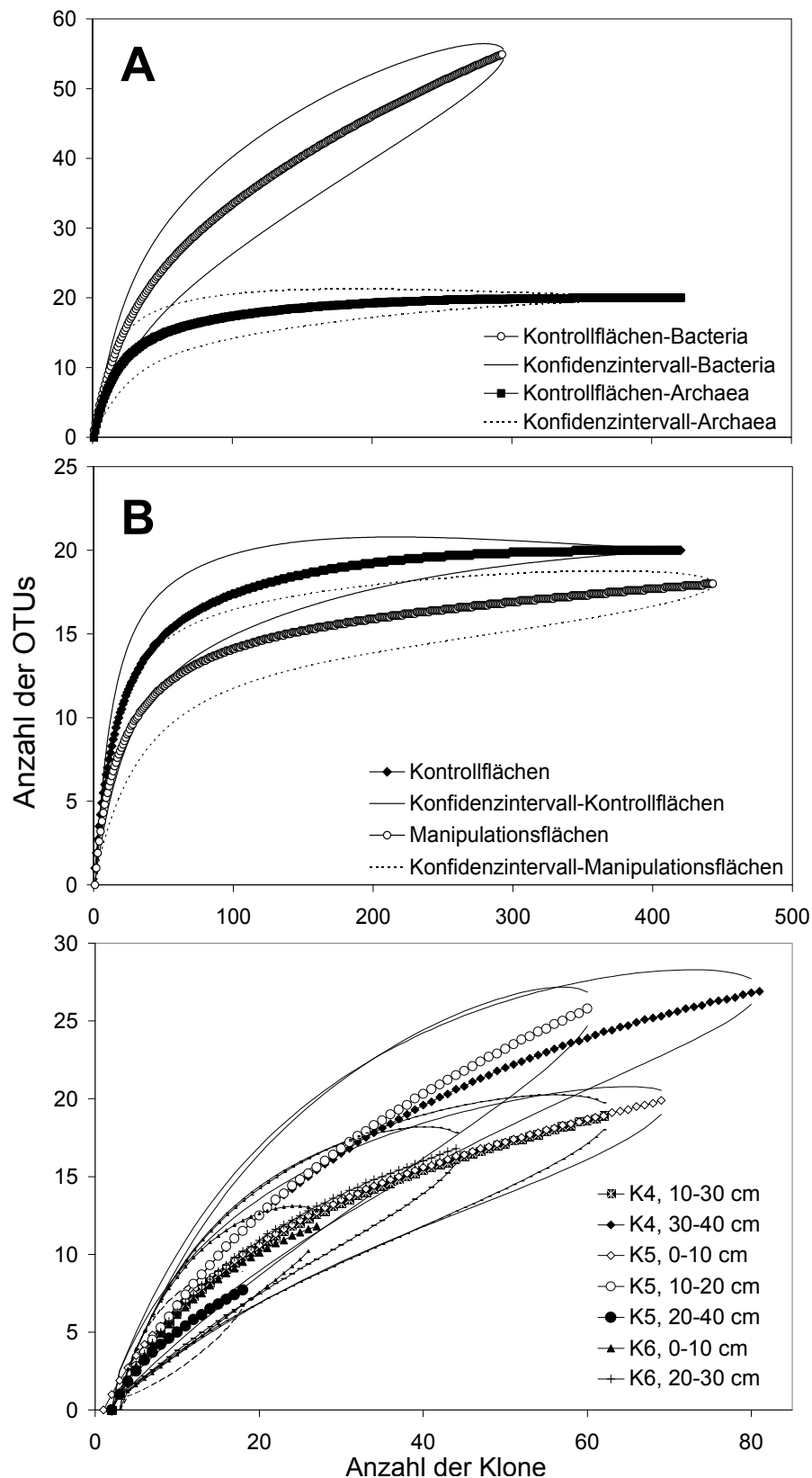


Abbildung 3.19: Rarefaction Analyse von *Bacteria*- und *Archaea*-16S rRNA Genbibliotheken der Kontrollflächen (A). Vergleich der *Archaea*-16S rRNA Genbibliotheken (B) der Kontroll- und Manipulationsflächen ($n=3$). Vergleich der *Bacteria*- (C) 16S rRNA Genbibliotheken von unterschiedlichen Tiefen der Kontrollflächen (K4-K6); OTU, operational taxonomic unit (entspricht unterschiedlichen RFLP Mustern).

3.4.3. Identifizierung und Tiefenprofil der *Bacteria* und *Archaea* im Niedermoor

18 von 27 detektierten T-RFs mit einer Länge von 67, 71, 82, 174, 184, 188, 191, 196, 203, 207, 210, 214, 216, 222, 225, 228, 232, 238 bp wurden *Bacteria*- 16S rRNA Gensequenzen aus dem Moorboden zugeordnet (Abbildung 3.20 A, Tabelle 3.5). Das T-RF mit 67 bp Länge war indikativ für *Actinomycetales* und abundant in 10-30 cm Tiefe (Maximum 20-30 cm Tiefe, Abbildung 3.20). T-RFs indikativ für *Rhodospirillaceae* kamen in allen Tiefen vor und besaßen die größte Abundanz in 30-40 cm Tiefe. Das T-RF, das indikativ für *Clostridiaceae* und *Acidobacteriaceae* (beide 82 bp) war, kam in einer Tiefe von 0-20 cm vor und besaß dabei die höchste Abundanz in 10-20 cm Tiefe (Abbildung 3.20 A, Tabelle 3.5). Das T-RF, das indikativ für *Cyanobacteria* (174 bp) war, zeigte die höchste Abundanz in 0-10 cm Tiefe. Das T-RF indikativ für *Rhodospirillaceae* (184 bp), kam in allen Tiefen vor und besaß die höchste relative Abundanz in 20-30 cm Tiefe. Ein Vorkommen in allen Tiefen und die höchste Abundanz in 20-30 cm Tiefe zeigten T-RFs, die indikativ für *Actinobacteria*, *Defferibacterales* (beide 196 bp), *Acidobacteriaceae*, *Neisseriaceae* und *Pseudomonadaceae* (alle 203 bp) waren. Das T-RF indikativ für *Dehalococcoides* (188 bp) zeigte die höchste Abundanz in 10-20 cm Tiefe. Die T-RFs, die indikativ für *Syntrophaceae*, *Neisseriaceae*, *Myxococcales* (alle 207 bp), *Rhodospirillales* und *Clostridiaceae* (beide 222 bp) waren, kamen in allen Tiefen vor und zeigten die höchste Abundanz in 30-40 cm Tiefe. T-RFs indikativ für *Syntrophaceae*, *Neisseriaceae* (beide 210 bp), *Acidobacteriaceae* (214, 216 und 238 bp) und *Nitrospiraceae* (228 bp) zeigten die höchste Abundanz in 0-10 cm Tiefe. Das T-RF, das indikativ für *Gallinonellaceae* (225 bp) war, kam nur in 30-40 cm Tiefe vor.

4 der 28 detektierten T-RFs mit 61, 67, 118 und 186 bp Länge wurden *Archaea*-16S rRNA Gensequenzen aus dem Moorboden zugeordnet (Abbildung 3.20 B, Tabelle 3.5). T-RFs indikativ für *Crenarchaeota* (118, 186 bp) und *Thermoplasmatales* (118, 186 bp) zeigten eine hohe relative Abundanz in allen Tiefen, was darauf hindeutet, dass sie im Moor weit verbreitet sind. Das T-RF indikativ für *Methanobacteriaceae* und *Crenarchaeota* (beide 67 bp) war abundant in 10-30 cm Tiefe und hatte die höchste Abundanz in 10-20 cm Tiefe (Abbildung 3.20 B, Tabelle 3.5).

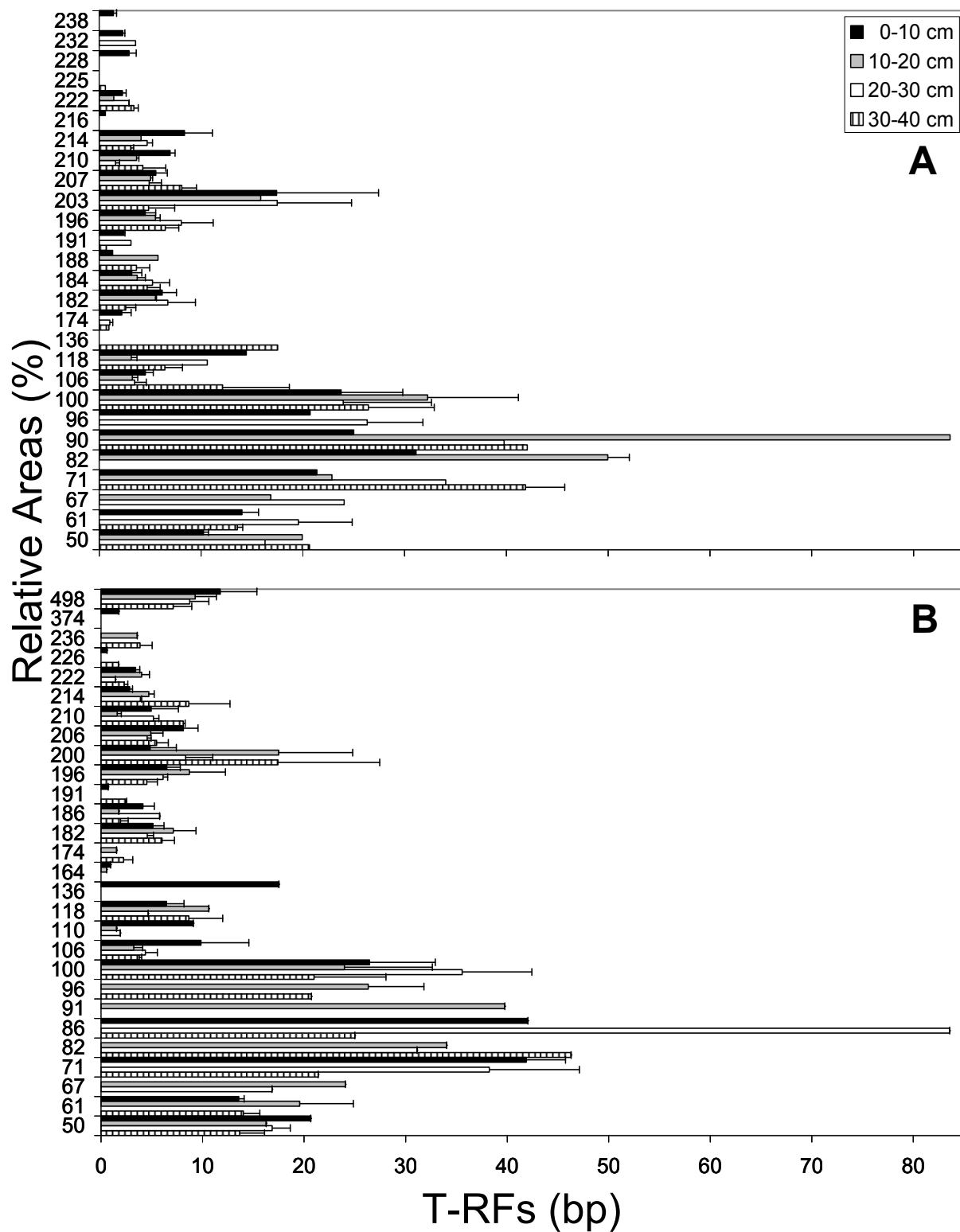


Abbildung 3.20: T-RFLP Profile von amplifizierten *Bacteria* (A) und *Archaea*- (B) 16S rRNA Genen der unterschiedlichen Tiefen und gemittelten Probenahmestandorten (K4-6 und A4-6). Fehlerbalken sind Standardfehler ($n=6$).

Tabelle 3.5: Detektierte T-RFs, ihre repräsentativen Klone und ihre Ähnlichkeit zu der nächsten Sequenz und der nächsten kultivierten Art.

Zuordnung der Sequenzen ^a (Registrierungsnummer; Anzahl der Sequenzen)	Nächste verwandte Sequenz (Registrierungsnummer)	Ähnlichkeit (%)	Nächster kultivierter Verwandter (Registrierungsnummer)	Ähnlichkeit (%)	T-RF (bp)
<i>Actinobacteria</i>					
<i>Acidothermaceae</i>					
B1-65 (AM773943)	<i>Kineosporia rhamnosa</i> (AB003935)	90	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> (X70635)	90	67
<i>Acidimicrobiaceae</i>					
B2-3 (AM773969)	Uncultured bacterium (AF225451)	92	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> (U75647)	89	196
<i>Alphaproteobacteria</i>					
<i>Rhodospirillaceae</i>					
B1-62 (AM773940)	Uncultured bacterium (AF523950)	96	<i>Azospirillum irakense</i> (Z29583)	87	71
B2-8 (AM773974)	Uncultured bacterium (AJ295647)	96	<i>Skermanella parooense</i> (X90760)	90	191
<i>Acetobacteraceae</i>					
B1-35 (AM773626)	Uncultured bacterium (AY491584)	88	<i>Muricoccus roseus</i> (AJ488505)	87	222
<i>Rhodobiaceae</i>					
B2-31 (AM773994)	Uncultured bacterium (AF529343)	98	<i>Roseospirillum parvum</i> (AJ011919)	93	238
<i>Acidobacteria</i>					
<i>Acidobacteriaceae</i>					
B1-33 (AM773624)	Uncultured bacterium (AJ292584)	93	<i>Holophaga foetida</i> (X77215)	80	82
B1-79 (AM773954)	Uncultured bacterium (AF523979)	90	<i>Holophaga foetida</i> (X77215)	80	191
B1-19 (AM773613)	Uncultured bacterium (AF529124)	96	<i>Holophaga foetida</i> (X77215)	93	203
B1-25 (AM773618; 4)	Uncultured bacterium (AF523899)	95	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (D26171)	91	214
B2-24 (AM773989; 2)	Uncultured bacterium (AJ582046)	95	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (D26171)	93	216
B1-84 (AM773958)	Uncultured bacterium (AF523979)	97	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (D26171)	85	238
<i>Clostridia</i>					
<i>Clostridiaceae</i>					
C-2C14-A3 (AM910704)	<i>Clostridium</i> sp. B904-4 (AB114236)	97	<i>Clostridium pasteurianum</i> (M23930)	95	82
C-1C14-A2 (AM910703)	<i>Clostridium</i> sp. T7 (AF281142)	96	<i>Clostridium scatologenes</i> (M59104)	93	222
<i>Syntrophomonadaceae</i>					
B1-44 (AM773924)	Uncultured bacterium (AB004577)	90	<i>Anaerobaculum thermoternum</i> (U50711)	83	214
<i>Cyanobacteria</i>					
Family 1.1					
B2-13(AM773979)	Uncultured bacterium (AY328599)	82	<i>Gloeobacter violaceus</i> (AF132790)	78	174
<i>Dehalococcoides</i>					
B1-48 (AM773929)	Uncultured bacterium (AJ307949)	80	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> (AF004928)	76	188
<i>Deferribacteres</i>					
<i>Deferribacteraceae</i>					
B1-49 (AM773930)	Uncultured bacterium (AF424302)	86	<i>Denitrovibrio acetiphilus</i> (AF146526)	75	1 96
<i>Betaproteobacteria</i>					
<i>Nisseriaceae</i>					
C-2P4-A3 (AM910690; 2)	Uncultured bacterium (AB013258)	96	<i>Chromobacterium violaceum</i> (AY117554)	92	203
C-1C12-A8 (AM910670)	Uncultured bacterium (AB013258)	96	<i>Chromobacterium violaceum</i> (AY117554)	91	207

C-2P4-A9 (AM910693)	Uncultured bacterium (AB013258)	94	<i>Chromobacterium violaceum</i> (AY117554)	90	210
<i>Hydrogenophilaceae</i> B2-28 (AM773992)	Uncultured bacterium (AF407387)	96	<i>Thiobacillus denitrificans</i> (AJ243144)	93	225
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Pseudomonadaceae</i> X4A6 (AM712586)	<i>Pseudomonas</i> sp. (AF098466)	93	<i>Pseudomonas putida</i> (AJ308312)	93	203
<i>Enterobacteriaceae</i> C-1G4-A2 (AM910661; 1)	Uncultured bacterium clone rRNA198 (AY958971)	97	<i>Serratia fonticola</i> (AJ233429)	98	232
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophaceae</i> B2-27 (AM773991)	Uncultured bacterium (AJ519663)	85	<i>Desulfomonile tiedjei</i> (M26635)	92	207
B1-83 (AM773957)	Uncultured bacterium (AF523950)	80	<i>Desulfomonile tiedjei</i> (M26635)	76	210
<i>Cystobacteraceae</i> B1-6 (AM773605; 6)	Uncultured bacterium (AF523967)	90	<i>Stigmatella aurantiaca</i> (M94281)	80	207
<i>Nannocystaceae</i> B1-52 (AM773933)	Uncultured bacterium (AF523881)	92	<i>Nannocystis exedens</i> (M94279)	83	238
<i>Nitrospira</i> <i>Nitrospiraceae</i> B2-5 (AM773971)	Uncultured bacterium (AF349765)	93	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> (X86776)	87	228
<i>Verrucomicrobiae</i> <i>Verrucomicrobiaceae</i> B1-46 (AM773925;1)	Uncultured <i>Verrucomicrobium</i> (AY211073)	96	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> (X90515)	86	232
<i>Crenarchaeota</i> Group 1.3 K1-3-A1 (AM910728)	Uncultured archaeon (U81774)	95	<i>Thermofilum pendens</i> (X14835)	78	61
X13-5-A5 (AM712593)	Uncultured archaeon (AF424775)	99	<i>Thermofilum pendens</i> (X14835)	80	196
Group I.1a K2-1-A4 (AM910735, 5)	Uncultured archaeon (AB019729)	85	Candidatus ' <i>Cenarchaeum symbiosum</i> ' (U51469)	85	118
K2-1-A8 (AM910738)	Uncultured archaeon (AB019729)	87	Candidatus ' <i>Cenarchaeum symbiosum</i> ' (U51469)	86	186
<i>Thermoplasmatales</i> K2-3-A1 (AM910743, 21)	Uncultured archaeon (AF419653)	70	<i>Thermoplasma acidophilum</i> (M20822)	70	118
<i>Methanosarcina</i> <i>Methanosarcinaceae</i> X13-5-A6 ^b (AM712594, 2)	<i>Methanosarcina</i> sp. (U81777)	98	<i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140)	98	186
<i>Methanobacteriales</i> <i>Methanobacteriaceae</i> X13-5-A3 ^b (AM712591)	Uncultured archaeon (U81775)	97	<i>Methanobacterium curvum</i> (AF276958)	96	91

^a Sequenzlänge von 700-900 bp

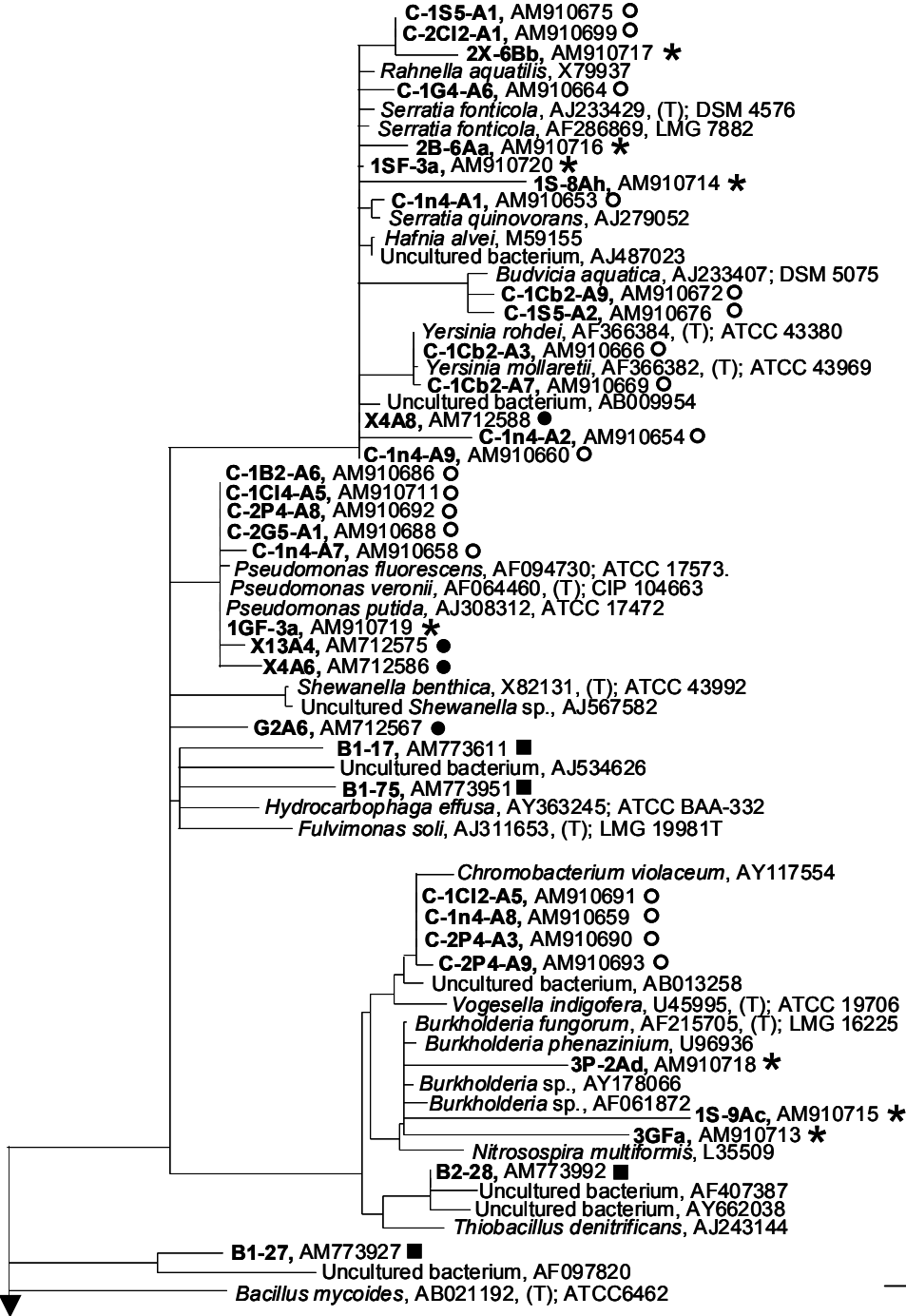
3.4.4. Zusammenfassende Analyse

Mit den unterschiedlichen Methodenansätzen wie Kultivierung, SIP und direkter 16S rRNA Genanalyse wurden zum Teil verschiedene phylogenetische Gruppen innerhalb der *Bacteria* und *Archaea* detektiert. Deshalb wurden zusammenfassend nochmals alle detektierten *Bacteria*- und *Archaea*-16S rRNA Gensequenzen in phylogenetischen Stammbäumen dargestellt (Abbildung 3.21 und 3.22). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die angewandten Methoden in ihrer Detektierbarkeit variieren.

Gammaproteobacteria

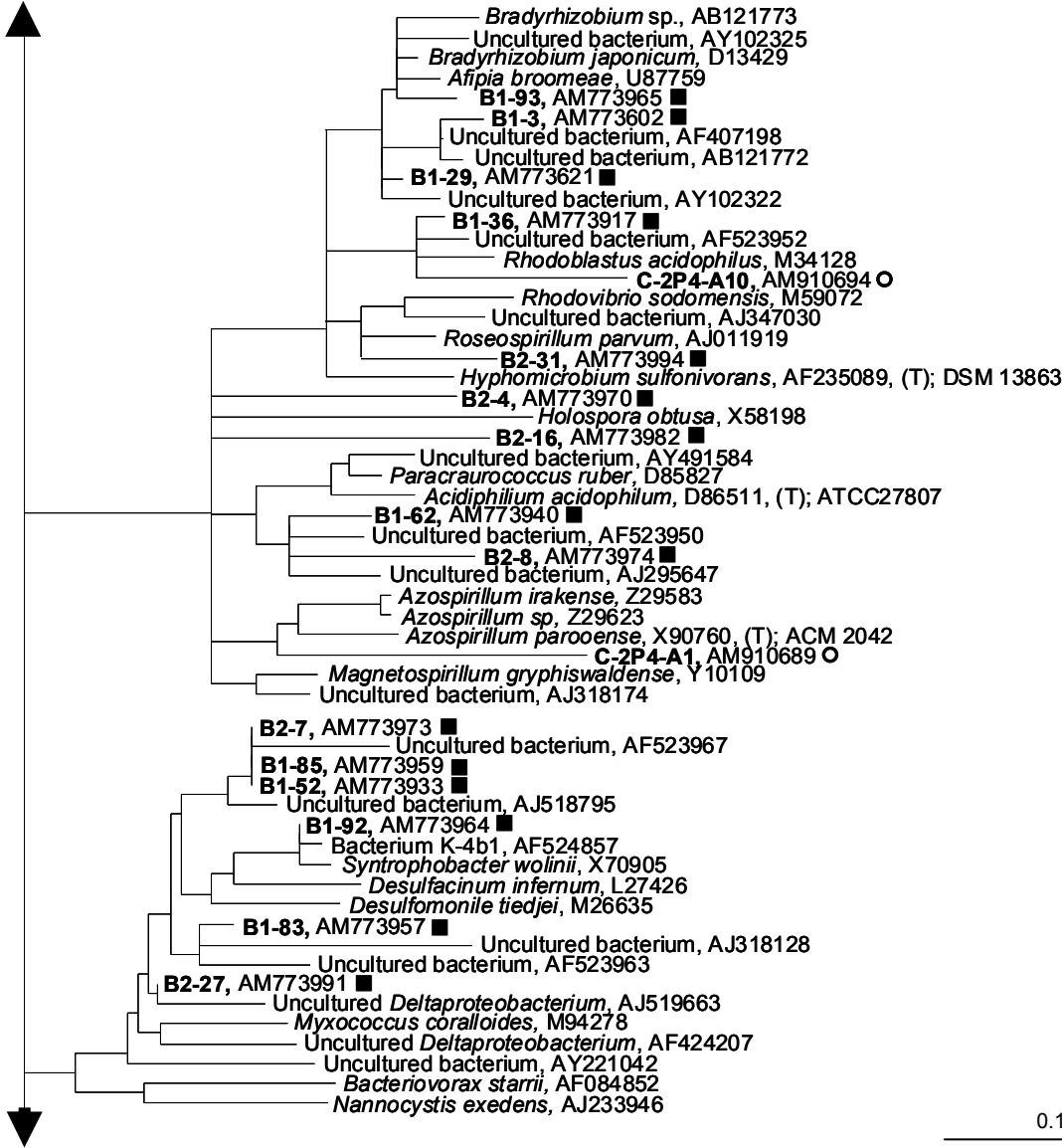
Betaproteobacteria

Bacilli



Alphaproteobacteria

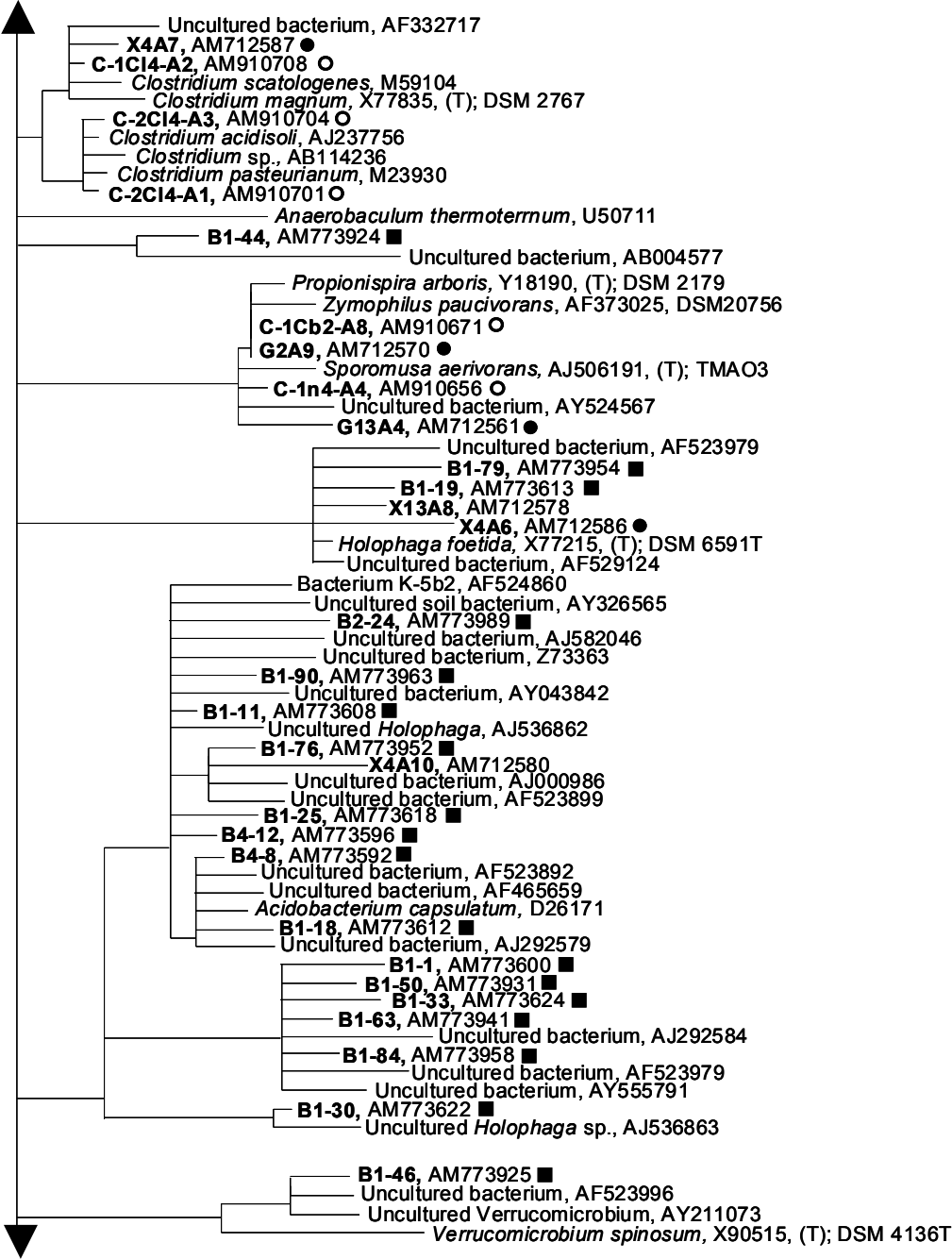
Deltaproteobacteria



Clostridia

Acidobacteria

Verrucomicrobia



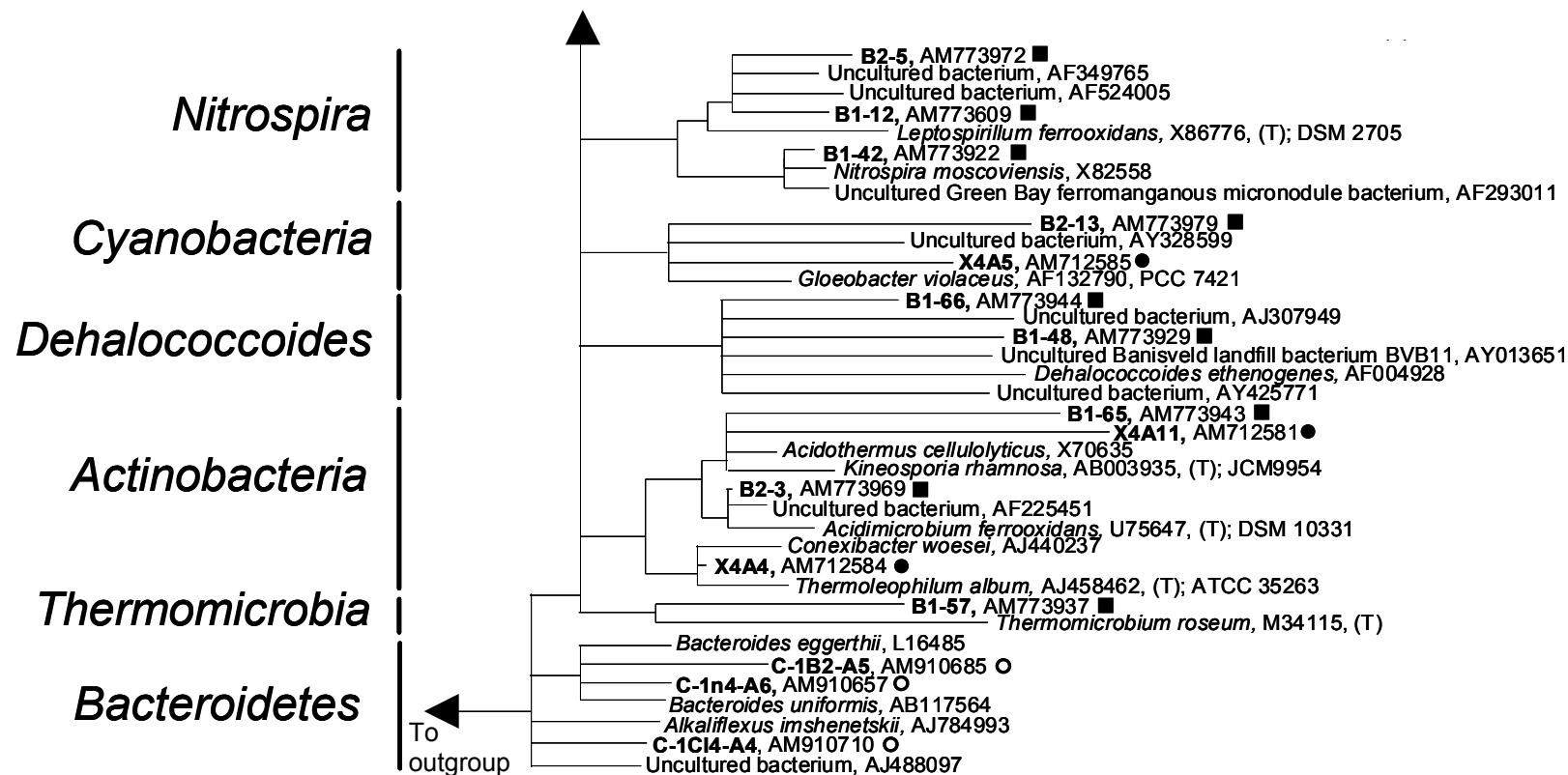


Abbildung 3.21: Phylogenetischer Konsensusbaum von *Bacteria*-16S rRNA Genen, die durch Stable Isotope Probing (●), Anreicherung (○), Isolierung (*), und direkter 16S rRNA Genanalyse (■) detektiert wurden. Pfeile deuten die Weiterführung der Äste auf der folgenden Seite an. Der gezeichnete Maßstab repräsentiert 10% Sequenzunterschied. Die Randgruppe (outgroup) ist *Aspergillus clavatoflavus* (U2923).

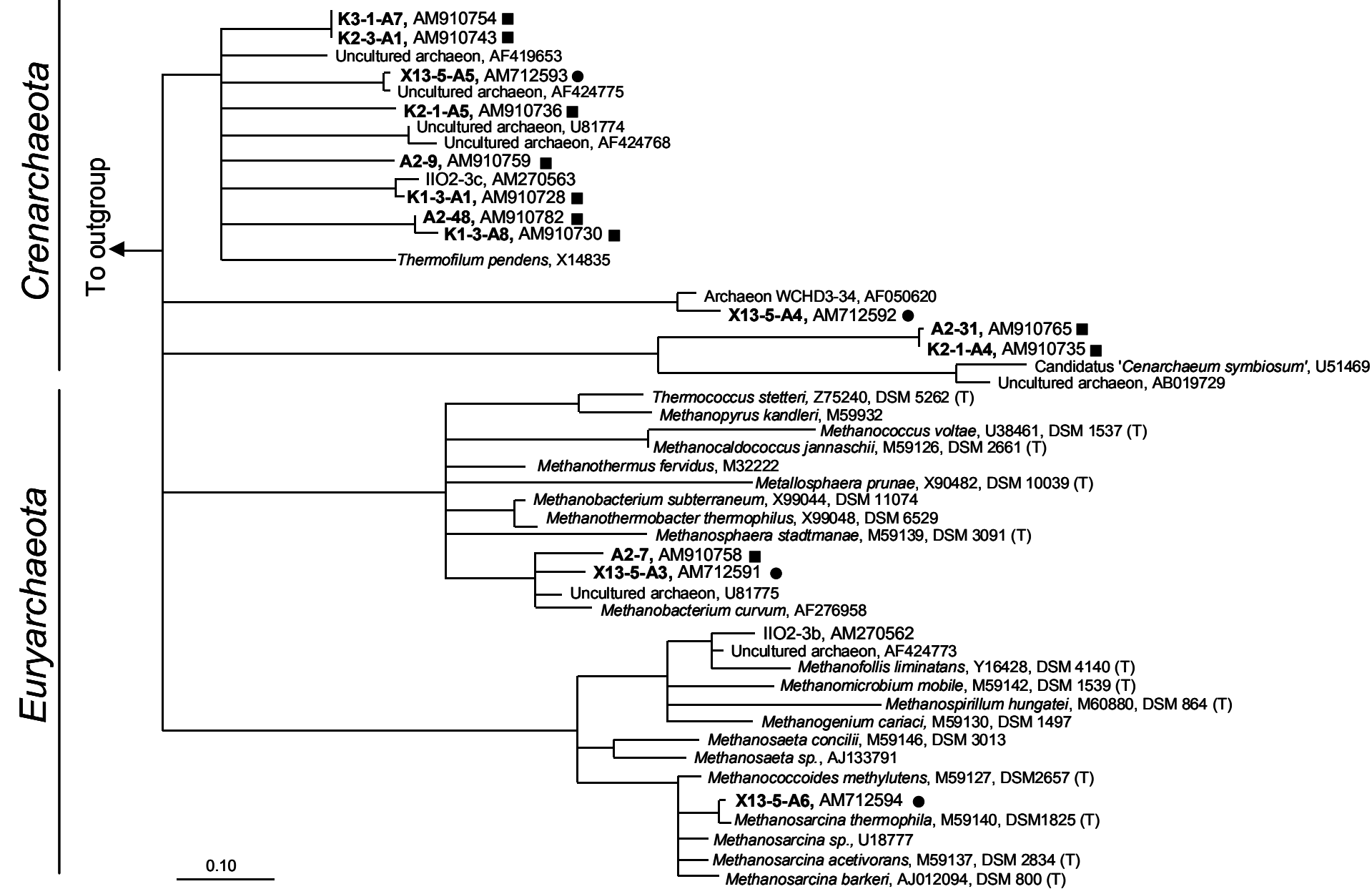


Abbildung 3.22: Phylogenetischer Konsensusbaum der *Archaea*-16S rRNA Gene, die mit Stable Isotope Probing (●) oder direkter 16S rRNA Genanalyse (■) detektiert wurden. Der gezeichnete Maßstab repräsentiert 10% Sequenzunterschied. Die Randgruppe (outgroup) ist *Clostridium acetobutylicum* (U16147).

3.5. Entwicklung des *Archaea*-Phylochips

Um die Gemeinschaft der Archaeen im Niedermoor schnell und einfach detektieren zu können, wurde versucht ein RNA Microarray zu erstellen. Die Kenntnis über die Phylogenie der Zielgruppen ist für die Entwicklung von Oligonukleotiden mit hierarchischer Spezifität essentiell. Somit diente die auf 16S rRNA basierende Diversitätsanalyse von Archaeen dieser Studie als Referenz für die gesamte *in silico* Sondenentwicklung.

3.5.1. Auswahl und *in silico* Entwicklung *Archaea*- spezifischer Sonden

19 Sonden wurden insgesamt generiert, wobei 7 Sonden auf Sequenzen basierten, die in dieser oder einer anderen über den gleichen Standort abgefassten Studie (Wüst et al., 2008) detektiert wurden (Tabelle 3.6). Die restlichen Sonden wurden, basierend auf Sequenzen beschriebener Archaeen, die die jeweilige phylogenetische Gruppe repräsentierten, generiert. Die Sonden wurden nach einer ähnlichen Schmelztemperatur (T_m) von ca. 50-60°C, einer Länge von 18 Oligonukleotiden (ohne T-Spacer) selektiert. Dabei sollte die Sonde möglichst viele zentral angeordnete Fehlpaarungen (mismatches) innerhalb der Zielsequenz nicht gewünschter Organismen besitzen. Zur Vervollständigung des Archaeen-Phylochips wurden zusätzlich Sonden generiert oder bereits publizierte Sonden (Tabelle 2.13, Tabelle 3.6) hinzugefügt, die alle Zielgruppen innerhalb der *Archaea* erfassen, obwohl sie in dem untersuchten Standort nicht detektiert wurden. Es sollten alle bekannten phylogenetischen Gruppen innerhalb der *Archaea* mit dem Phylochip detektiert werden.

Tabelle 3.6: *In silico* entwickelte Sonden, deren phylogenetische Zielgruppe, Sequenz, kalkulierte Schmelztemperatur (T_m) und Bindungsenthalpie ΔG .

Phylogenetische Zielgruppe	Sonden-name	Sondensequenz (5' - 3') ^a	T_m (°C)	ΔG
<i>Methanosarcina</i>				
X13-5-A6	MSA1	TCT GGC AGT ATC CCC CGA	57.0	-18.5
<i>Methanosaeta</i>				
<i>Methanosaetaceae</i>	MXA1	CGT GCC CCT AGC TTT CGT	54.8	-18.1
I12k2 & I102-4 ^b	MXA2	CCC TTG CCG TCA GAT CCG	55.5	-18.2
<i>Methanobacteriales</i>				
<i>Methanobacteriales</i>	MBA8	GCT GCC GGT GTT ACC GCG	59.8	-20.3
<i>Methanothermus</i>	MBA9	AAG ACC TTT CGG CGA GGC	57.0	-18.3
<i>Methanobacterium</i> / <i>Methanothermobacter</i>	MBA10	TCG CCA CGA ACA CAA GGT	55.7	-18.4
X13-5-A3	MBA1	GAG CAG CTC GAG GCC ATT	56.8	-18.2
<i>Thermoplasmatales</i>				
<i>Thermoplasmata</i>	TPA1	CGG CGG CTG GCA CCC GTC	64.4	-22.3
Klon-Cluster 1	TPA3	AGT CCC ATC CTG GAG CGA	55.9	-18.2
Klon-Cluster 2	TPA2	CTT GGA GTT CCC CCA TCG	52.2	-16.7
<i>Crenarchaeota</i>				
<i>Crenarchaeota</i>	UCA1	CGG AAC ACC CCC GGG AAA	49.6	-15.5
Klon-Cluster 1	UCA2	TCC TAT CCC GAT AGC AGT	49.9	-15.7
Klon-Cluster 2	UCA3	AGG ACA GGC AAA AGA CTC	49.1	-15.4
<i>Methanomicrobiales</i>				
<i>Methanomicrobiales</i> ^c	MMA1	GGC AAC TGT TGG CGT GGG	57.2	-19.0
<i>Methanomicrobiaceae</i>	MMA2	TGG CAA CTG TTG GCG TGG	56.5	-18.8
<i>Methanogenium</i>	MMA3	ACC TCA CTC GGA TGG TTT	51.7	-16.2
<i>Methanospirillum</i>	MMA4	TGT CAA CGA CAC AAC CTC	50.1	-16.0
<i>Methanococcales</i>				
<i>Methanococcus</i>	MCA1	AAC ATA GGG CAC GGG TCT	54.5	-17.2
<i>Methanopyrales</i>				
<i>Methanopyrus</i>	MPA1	AAC TGC GGG CGG GGG TCT	63.7	-20.9

^a 18 Oligonukleotide mit 30 dTTPs (T-Spacer) und einer Aminomodifikation am 5'-Ende

^b Sequenzen aus Wüst et al., 2008

^c Sonde MMA1 detektiert *in silico* die phylogenetischen Gruppen *Methanoplanus*, *Methanoculleus*, *Methanogenium*, *Methanocalculus*, *Methanomicrobium*

3.5.2. Position der Sonden auf dem Microarray

Die Sonden wurden auf dem Microarray innerhalb eines Subarrays in Duplikaten angeordnet (Tabelle 3.7) und es befanden sich jeweils drei Subarrays parallel zueinander auf einem Objektträger (Abbildung 3.23). Die Aminomodifikation am 5'-Ende der Sonde diente zur chemischen Anheftung an der mit Aldehydgruppen

bedeckten Glasoberfläche des Objektträgers. Die restlichen reaktiven Aldehydgruppen auf den Objektträgern wurden mittels NaBH_4 reduziert, um eine Fehlpaarung zu verhindern.

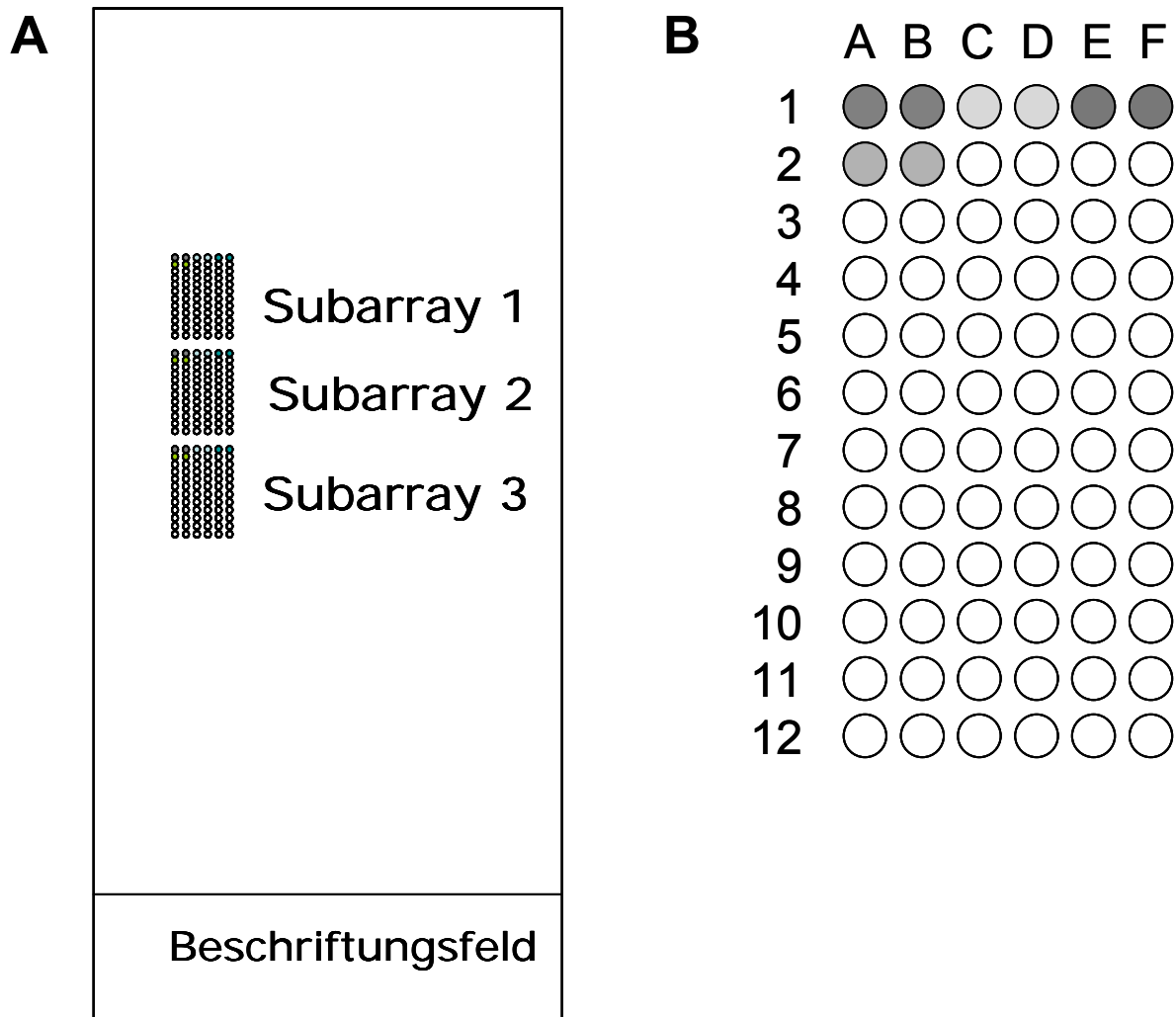


Abbildung 3.23: Schematische Darstellung des Phylochips. Die Anordnung der drei Subarrays auf dem Objektträger (A) und die Anordnung der Sonden innerhalb eines Subarrays (B; $n=2$).

Tabelle 3.7: Anordnung aller ausgewählten Sonden auf dem Microarray (vergleiche Abbildung 3.21 B).

Sondenname	Position auf dem Microarray
ARC915	1 A, B
EURY514	1 C, D
CREN512	1 E, F
CREN569	2 A, B
UNIV1389c	2 C, D
EUB338	2 E, F
UNIV907	3 A, B
UNIV1389	3 C, D
MSMX860	3 E, F

MS1414	4 A, B
MS821	4 C, D
MSA1	4 E, F
MX1361	5 A, B
MXA1	5 C, D
MXA2	5 E, F
MBA8	6 A, B
MBA9	6 C, D
MBA10	6 E, F
MBA1	7 A, B
TPA1	7 C, D
TPA2	7 E, F
TPA3	8 A, B
UCA1	8 C, D
UCA2	8 E, F
UCA3	9 A, B
MMA1	9 C, D
MMA2	9 E, F
MMA3	10 A, B
MMA4	10 C, D
MCA1	10 E, F
MPA1	11 A, B
NON	11 C, D
CONT-COMP	11 E, F
Blank ^a	12 A, B
Blank	12 C, D
Blank	12 E, F

^a ddH₂O

Nach der Anheftung der Sonden auf den Objektträger wurden diese mikroskopisch in 40-facher und 100-facher Vergrößerung untersucht (Abbildung 3.24 A und B). Es waren gleichförmige Kreise auf dem Objektträger in den Bereichen zu erkennen, in denen sich auch die Sonden theoretisch befinden sollten, was darauf hindeutete, dass das Spotting der Sonden erfolgreich war.

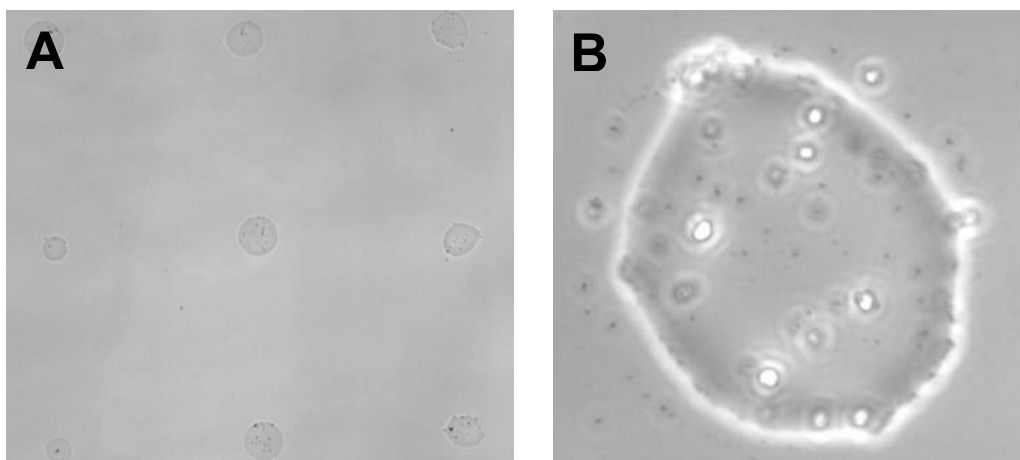


Abbildung 3.24: Mikroskopische Aufnahmen der gespotteten Sonden in 40-facher (A) und 100-facher (B) Vergrößerung.

3.5.3. Hybridisierung

Zur Kontrolle des Spottings wurde mit einem Cy3-markierten PolyA-Oktamer hybridisiert, das an den T-Spacer der Sonde band. Bei jeder Hybridisierung wurde ein zur CONT Sonde (Tabelle 2.13) komplementäres, mit Cy5-markiertes Kontroll-Oligonukleotid (CONT-COMP) hinzugefügt, um eine fehlerhafte Hybridisierung ausschließen zu können (Positiv-Kontrolle). Bei der Spotting-Kontrolle wurden stets positive Signale für die CONT-Sonde bei einer Wellenlänge von 532 nm detektiert. Dies zeigt, dass die Hybridisierung erfolgreich war. Das Cy3-markierte PolyA-Oktamer hybridisierte an die T-Spacer aller Sonden auf dem Microarray (Abbildung 3.25 B), was zeigte, dass das Spotting erfolgreich war. DNA von Referenzkulturen (Tabelle 2.5) wurde erfolgreich in RNA umgeschrieben (Daten nicht gezeigt), wobei während der Transkription dUTPs verwendet wurden, die ein Drittel mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen (2.9.11.1.) markiert waren. Die Markierung der RNA war erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Die fragmentierte und markierte RNA wurde bei Temperaturen von 45, 50, 55, 60, 65 oder 70°C hybridisiert (2.9.11.5.). Für CONT-COMP wurden stets Signale detektiert, jedoch konnte für keine andere Sonde ein Signal detektiert werden, was zeigte, dass trotz fehlerfreier Hybridisierung keine Bindung an die jeweiligen spezifischen Sonden oder die allgemeinen Archaeen-Sonden stattfand (Tabelle 2.13).

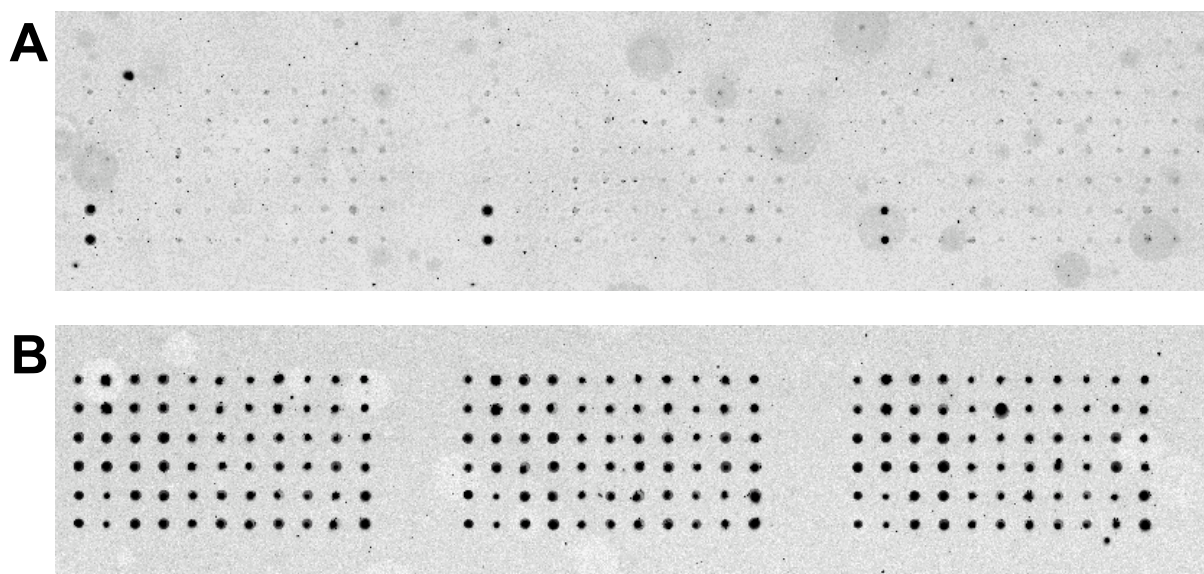


Abbildung 3.25: Gescannte Mikroarraybilder der Wellenlänge 532 nm, die das gebundene, Cy3-markierte CONT-COMP Oligonukleotid detektiert (A) und der Wellenlänge 635 nm, die das gebundene Cy5-markierte Poly A-Oktamer (B) detektiert.

4. DISKUSSION

4.1. Im Niedermoor abundante potentielle Fermentierer

Moore besitzen relativ konstante mit direkter Zellzählung (Acridine-orange Counts) ermittelte Gesamtzellzahlen (10^8 - 10^9 ml⁻¹; Williams & Crawford, 1983; Gsell et al., 1997). In einer anderen Studie über das Untersuchungsgebiet Schlöppnerbrunnen lagen die mit direkter Zellzählung (DAPI) ermittelten Gesamtzellzahlen bei 2,1 bis $4,4 \times 10^9$ Zellen g_{FG}⁻¹ (Reiche et al., 2008) und 5×10^{10} Zellen g_{TG}⁻¹, wovon in 0-10 cm Tiefe ca. 75% der detektierten Zellen aktiv waren (Wüst, 2006). Diese Gesamtzellzahlen liegen im oberen Bereich der Gesamtzellzahlen, die für Böden bekannt sind (Dedysh et al., 2006; Janssen et al., 2002; Westermann, 1993; Williams & Crawford, 1983), woraus man auf eine hohe Abundanz von aktiven Mikroorganismen im untersuchten Niedermoor schließen kann. „Most Probable Numbers“ (MPNs) für Glucose-abbauende Mikroorganismen in einem Moor in Minnesota (USA) ergaben Zellzahlen von 10^4 - 10^6 ml⁻¹ (Williams & Crawford, 1983). MPNs für fakultative Aerobier und obligate Anaerobier in dem untersuchten Niedermoor betrugen $3,0 \times 10^6$ Zellen g_{TG}⁻¹ und für Methanogene $6,8 \times 10^4$ Zellen g_{TG}⁻¹ (Wüst, 2006; Wüst et al., 2008), was die Abundanz von fakultativen Aerobiern und/oder obligaten Anaerobiern und Methanogenen im Niedermoor belegt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Wüst et al. (2008), wurden in der vorliegenden Arbeit fakultative Aerobier und obligate Anaerobier bis 10^6 Zellen g_{TG}⁻¹ angereichert (3.1.1.). Dennoch ist nach wie vor wenig über die Abundanz von Fermentierern und ihre Struktur-Funktionsbeziehungen in Mooren bekannt. Im Grunde fehlt immer noch ein mechanistisches Verständnis über die Verknüpfung von Prozessen und die dafür verantwortlichen Mikroorganismen (Gutknecht et al., 2006). Eines der Ziele dieser Arbeit war deshalb durch kultivierungsabhängige Methoden Struktur-Funktionsbeziehungen der mikrobiellen Gemeinschaft in dem gemäßigt sauren Niedermoor zu untersuchen (3.1.).

Weil in allen untersuchten anoxischen Anreicherungen der Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-5} Fermentationsprodukte (z. B. Formiat, Lactat, Butyrat, Acetat) detektiert wurden, kann man daraus schließen, dass obligat anaerobe oder fakultativ aerobe Fermentierer dominierend im Niedermoor sind (3.1.1.). Die 16S rRNA Genanalyse dieser Kulturen zeigte, dass diverse Mitglieder

der *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria*, *Pseudomonadaceae*, *Bacteroidetes* und *Clostridia* vorkamen. Das Vorkommen dieser phylogenetischen Gruppen in Mooren wurde bereits in mehreren Studien belegt (z. B. Dedysh et al., 2006, Kraigher et al., 2006).

Alphaproteobacteria

Innerhalb der *Alphaproteobacteria* wurde eine 16S rRNA Gensequenz, die in Pektin-haltigem Medium der Verdünnung 10^{-4} detektiert wurde, *Skermanella parooense* (X90760, 90% Genähnlichkeit; Tabelle 3.2) zugeordnet. Die Gattung *Skermanella* der Familie *Rhodospirillaceae* ist obligat chemoheterotroph und fakultativ anaerob, wobei es einen fermentativen Metabolismus besitzt (Brenner et al., 2005b). Eine neue fakultative, moderat säuretolerante (Wachstum bei pH 4-7) Art innerhalb der *Rhodospirillaceae* wurde bereits aus einem mesotrophen sibirischen Niedermoor isoliert (Sizova et al., 2007). Dieses Isolat vergärt Glucose und organische Säuren (z. B. Succinat); Xylose wurde dabei nicht getestet (Sizova et al., 2007). 16S rRNA Gensequenzen, die der Familie *Rhodospirillaceae* zugehörig waren, wurden ebenfalls in der „schweren“ RNA-Fraktion des ^{13}C -Glucose Experiments detektiert. Ein T-RF, das indikativ für solche Organismen war (440 bp, Tabelle 3.4, Abbildung 3.13), besaß eine höhere relative Abundanz nach fortschreitender Inkubation sowohl im ^{13}C -Xylose- als auch im ^{13}C -Glucose-Experiment. Dies ist ein Hinweis, dass Mitglieder der *Rhodospirillaceae* in anoxischen Moorbodenaufschlammungen Xylose und Glucose abbauen. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass Mitglieder der *Rhodospirillaceae* im Niedermoor abundante (10^4 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$) Fermentierer sind, die in anoxischen Bodenaufschlammungen aktiv Xylose und Glucose verwerten. Somit könnten vermutlich Mitglieder der *Rhodospirillaceae* als primäre Fermentierer eine wichtige Rolle im anoxischen Kohlenstofffluss zu CH_4 im Niedermoor spielen.

Eine weitere in Pektin-haltigem Medium detektierte 16S rRNA Gensequenz wurde *Rhodoblastus acidophilus* (M34128, < 90% Sequenzähnlichkeit; Tabelle 3.2) der Familie *Bradyrhizobiaceae* innerhalb der *Alphaproteobacteria* zugeordnet. Geht man vom zur detektierten 16S rRNA Gensequenz nächsten kultivierten Verwandten aus, so sind *Rhodoblastus*- Arten Frischwasser-Bakterien, die einen mäßig sauren pH (5,5-6) und photoheterotrophes Wachstum unter anoxischen Bedingungen in Anwesenheit von Licht bevorzugen (Imhoff, 2001). Jedoch ist mit einigen Substraten

auch anaerobes Wachstum durch Fermentation möglich (Imhoff, 2001). Somit sind im Niedermoor vermutlich potentiell neue Arten der *Bradyrhizobiaceae* (10^4 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$) abundant, wobei sie unter anoxischen Bedingungen Pektin oder aus Pektin hervorgehende Monomere (z. B. Xylose) vergären können.

Betaproteobacteria

Innerhalb der *Betaproteobacteria* wurden aus Medien mit verschiedenen Polymeren (z. B. Cellulose, Gelatine und Pektin) 16S rRNA Gensequenzen detektiert, die *Chromobacterium violaceum* (AY117554, 90 -94% Sequenzähnlichkeit) der Familie *Neisseriaceae* zugeordnet wurden. *Chromobacterium violaceum* wächst unter pH 5, ist fakultativ anaerob und fermentiert Kohlenhydrate ohne Gasbildung (Brenner et al., 2005b), verfügt aber auch über Gelatinasen (Brenner et al., 2005b). Dadurch kann man vermuten, dass Gelatine und diverse Kohlenhydrate (z. B. Cellulose) von Mitgliedern der *Neisseriaceae* im Moorboden über Fermentation abgebaut wurden. Die Tatsache, dass in den Verdünnungsstufen (10^{-5}), in der Mitglieder der Familie *Neisseriaceae* detektiert wurden, kein H_2 gebildet wurde (Tabellen 3.1 und 3.2), deutet darauf hin, dass die Fermentation der zugesetzten Polymere (z. B. Gelatine, Cellulose) oder deren Monomere durch diese Organismen stattgefunden hatte. Diese Ergebnisse zeigen, dass Mitglieder der Familie *Neisseriaceae* mit bis zu 10^5 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ im Niedermoor abundante fakultativ anaerobe Fermentierer sind.

Weitere Informationen über abundante fakultative Aerobier im Niedermoor lieferte die Isolierung von sieben Mikroorganismen, die drei verschiedenen phylogenetischen Familien zugeordnet wurden (*Burkholderiaceae*, *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonadaceae*; Tabelle 3.3.). Die 16S rRNA Gensequenzen von drei unterschiedlichen Isolaten wurden *Burkholderia phenazinium* (93-98% Sequenzähnlichkeit) innerhalb der *Burkholderiaceae* zugeordnet und stammten aus Medien mit Stärke, Gelatine und Pektin (3.1.2.). Aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeiten zum nächsten kultivierten Verwandten, wurde vermutlich eine potentiell neue Art innerhalb der *Burkholderiaceae* isoliert. Dass aus Medium mit Stärke ein Isolat mit minimalen Zellzahlen von 10^9 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ gewonnen wurde, deutet darauf hin, dass säuretolerante Arten der *Burkholderiaceae* abundant im Niedermoor sind. Man weiß bisher, dass Mitglieder der *Burkholderia* unter oxischen bzw. microaerophilen Bedingungen wachsen können (Belova et al.,

2006). Jedoch zeigte sich, dass das *Burkholderiaceae*-verwandte Isolat, das aus Stärke-haltigem Medium gewonnen wurde, Glucose auch unter anoxischen Bedingungen zu Lactat, Formiat, Acetat und Valeriat abbaute (3.1.2.). Somit könnte eine potentiell neue, fakultative *Burkholderiaceae*-verwandte, fermentierende Art isoliert worden sein. Der Abbau von Glucose könnte nach folgender Reaktion (stöchiometrisch nicht ausgeglichen, detektierte Verbindungen wurden fett markiert, Abbildung 3.3) ablaufen:



Dabei ist zu beachten, dass das Grundmedium geringe Mengen an Trypton und Hefe-Extrakt beinhaltete, was möglicherweise zusätzlich von dem Isolat genutzt wurde. Das Vorkommen von *Burkholderiaceae*-verwandten Arten in Mooren wurde auch von anderen Studien belegt, die die Isolierung von neuen Arten innerhalb der Familie der *Burkholderiaceae* aus einem *Sphagnum* Moor beschreiben (Opelt et al., 2007; Belova et al., 2006). *Burkholderiaceae*-verwandte Arten bedienen sich einem großen Spektrum an organischen Verbindungen (z. B. Glucose) als Kohlenstoff und Energiequelle (Brenner et al., 2005b). Für Böden sind stark fluktuierende Gaskonzentrationen (z. B. O₂) unter *in situ* Bedingungen charakteristisch (Paul et al., 2006). Es tritt ein Gastransport durch die Wurzeln der vorherrschenden Vegetation oder durch die Bodenmatrix auf, wobei der Gastransport durch die Bodenmatrix vom Wasserstand abhängig ist (Segers, 1998; Gutknecht et al., 2006). Durch diese schwierigen *in situ* Bedingungen, könnten sich wahrscheinlich einige Arten der *Burkholderiaceae* an fluktuierende Sauerstoffkonzentrationen angepasst haben und somit die Fähigkeit entwickelt haben unter strikt anoxischen Bedingungen durch Fermentation Energie zu konservieren.

Gammaproteobacteria

16S rRNA Gensequenz von zwei unterschiedlichen Isolaten wurde *Serratia fonticola* (98% Sequenzähnlichkeit, Tabelle 3.3) zugeordnet. Diese Bakterien wurden aus Stärke-haltigem Medium mit minimalen Zellzahlen von 10⁸ Zellen g_{TG}⁻¹ isoliert (3.1.2.). Die Gattung *Serratia* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*, ist fakultativ und kann Kohlenhydrate vergären (Brenner et al., 2005a). Tatsächlich wurde der Abbau von Glucose zu Ethanol, Formiat, Lactat, Acetat, Butyrat und Valeriat unter anoxischen Bedingungen bei 30°C detektiert (Abbildung 3.3). Es ist bekannt, dass

Serratia-Arten mit *Sphagnum*-Moosen assoziiert sein können (Opelt et al., 2007). Daher ist ein Vorkommen dieser Gattung in *Sphagnum*-bewachsenen Feuchtgebieten wie das Niedermoor Schlöppnerbrunnen wahrscheinlich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Serratia*-verwandte Arten mit bis zu 10^8 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ abundant im gemäßigt sauren Niedermoor sind und aus Stärke hervorgehende Glucose zu organischen Säuren und Alkoholen vergären (Abbildung 3.3), wobei sie vermutlich auch Stärke an sich degradieren können. Der Abbau von Glucose könnte durch eine gemischte Säurefermentation stattgefunden haben, die für Mitglieder der *Enterobacteriaceae* charakteristisch ist (z. B. Schlegel, 1992; Brenner et al., 2005a). Ein weiteres Isolat und mehrere 16S rRNA Gensequenzen aus anoxischen Anreicherungen (Tabellen 3.2 und 3.3) waren verwandt zu den Gattungen *Rahnella*, *Yersinia* und *Budvicia* und gaben weitere Hinweise, dass diese Mitglieder der Familie *Enterobacteriaceae* im Niedermoor mit bis zu 10^6 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ abundant sind (Tabellen 3.2 und 3.3). Die detektierten 16S rRNA Gensequenzen stammten aus Medien mit Cellulose, Cellobiose, Gelatine, Stärke und Xylan. Zudem wurde *Shigella*-verwandte RNA mit ^{13}C -Xylose und ^{13}C -Glucose markiert (Abbildung 3.13, Tabelle 3.4), was darauf hindeutet, dass diese Monosaccharide von diesen Organismen in anoxischen Bodenaufschlammungen degradiert wurden. Der zur mit SIP detektierten 16S rRNA Gensequenz nächste kultivierte Verwandte, *S. sonnei*, ist eine fakultativ, säure-resistente Art innerhalb der *Enterobacteriaceae*, die durch gemischte Säurefermentation Monosaccharide zu Formiat, Acetat und Ethanol ohne Gasbildung umwandelt (Brenner et al., 2005a). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass verschiedene Mitglieder der Familie *Enterobacteriaceae* (*Budvicia*, *Rahnella*, *Serratia*, *Shigella* und *Yersinia*) durch ihre hohe Abundanz ($\leq 10^8$ Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$) als fakultative Fermentierer eine bedeutende Rolle im anoxischen Kohlenstofffluss zu CH_4 im Niedermoor spielen.

Aus Gelatine-haltigem Medium wurde ein Organismus isoliert, der nahe verwandt zu *Pseudomonas veronii* war (99% Sequenzähnlichkeit, Tabelle 3.3). Zudem wurden bis zur Verdünnungsstufe 10^{-5} 16S rRNA Gensequenzen detektiert (Tabelle 3.2), die *P. veronii* zugeordnet wurden (96% Sequenzähnlichkeit, Tabelle 3.2), was darauf hindeutet, dass *P. veronii* und potentiell neue Arten der Familie *Pseudomonadaceae* im Niedermoor mit bis zu 10^5 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ abundant sind. *P. veronii* ist fakultativ aerob und wurde unter oxischen Bedingungen positiv für

Gelatine- und Zucker- (z. B. Glucose, Xylose) Abbau getestet (Elomari et al., 1996). Unter anoxischen Bedingungen kann *P. veronii* denitrifizieren (Elomari et al., 1996). Da das *Pseudomonas veronii*-verwandte Isolat unter anoxischen Bedingungen und in Abwesenheit von alternativen Elektronenakzeptoren (außer CO₂), Glucose zu Ethanol, Succinat, Lactat, Formiat, Acetat und Valeriat abbaute, kann man daraus schließen, dass dieses Isolat unter anoxischen Bedingungen durch Fermentation Energie konserviert. Dieses Isolat ging aus anoxischen Medien mit Gelatine hervor, was auf einen Gelatineabbau unter anoxischen Bedingungen hindeutet. Bekanntlich interagieren *Pseudomonadaceae*-Arten mit Pflanzen und sind mit deren Wurzeln assoziiert (Costa et al., 2007). *P. veronii* ist ein Pflanzenpathogen (Elomari et al., 1996) und könnte daher als solches im Niedermoor fungieren. Eine andere Studie zeigte mittels 16S rRNA Gen- und Fettsäure-Analysen, dass Arten der Familien *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Aeromonadaceae* und *Burkholderiaceae* mit *Juncus effuses* L. in einem Frischwasser-Feuchtgebiet assoziiert waren (Halda-Alija, 2003). Da in dieser Studie Mitglieder dieser Familien detektiert wurden und *Juncus effuses* L. ebenfalls in der Vegetation des untersuchten Moores vorkommt (Paul et al., 2006), besteht die Möglichkeit, dass einige detektierte Arten dieser Familien mit *Juncus effuses* L. assoziiert sind.

Bacteroidetes

In Medium mit Cellulose oder Butyrat wurden bis zur Verdünnung 10⁻⁴ 16S rRNA Gensequenzen detektiert, die den *Bacteroidetes* (91-92% Sequenzähnlichkeit) zugeordnet wurden. Aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeit ist anzunehmen, dass potentiell neue Arten innerhalb der *Bacteroidetes* detektiert wurden. Diese können vermutlich unter anoxischen Bedingungen Cellulose oder aus Cellulose hervorgehende Monomere (z. B. Glucose) und Butyrat unter anoxischen Bedingungen nutzen und sind im Moor abundant (10⁴ Zellen g_{TG}⁻¹). Mitglieder der *Bacteroidetes* wurden auch in einer anderen Studien über ein Niedermoor in Slowenien detektiert (Kraigher et al., 2006). Diese machten 3,5% der gesamten detektierten 16S rRNA Gene aus (Kraigher et al., 2006). Das Vorkommen von *Bacteroidetes* in einem sauren *Sphagnum*-Moor wurde in einer weiteren Studie belegt (Dedysh et al., 2006). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Mitglieder der *Bacteroidetes* womöglich in Mooren eine wichtige Rolle spielen und mit bis zu 10⁴ Zellen g_{TG}⁻¹ abundant sind.

Clostridia

In Cellulose-haltigem Medium der Verdünnung 10^{-4} wurden 16S rRNA Gensequenzen detektiert, die *Clostridium scatologenes* (98% Gensequenzähnlichkeit) und *C. acidisoli* (99% Gensequenzähnlichkeit) innerhalb der Familie *Clostridiaceae* zugeordnet wurden (Tabelle 3.2). *C. scatologenes* ist säuretolerant, obligat anaerob und verwertet Zucker (z. B. Cellobiose, Glucose, Xylose), organische Säuren (z. B. Lactat) und Alkohole (z. B. Ethanol, Propanol) und besitzt die Fähigkeit zur Acetogenese (Küsel et al., 2000). Diese Spezies wurde zudem als saccharolytischer und proteolytischer Fermentierer beschrieben, der Acetat und Butyrat als Hauptfermentationsprodukte bildet (Holdeman et al., 1977). Acetat und Butyrat wurden hauptsächlich in den Anreicherungen detektiert, aus der die 16S rRNA Gensequenz von *C. scatologenes* stammte, was darauf hindeutet, dass Acetat und Butyrat vermutlich als dominierende Produkte aus der Fermentation von Cellulose oder dessen Untereinheit Glucose durch *C. scatologenes* hervorgingen (Tabelle 3.1). *C. scatologenes* ist zudem acetogen, was zusätzlich die Ursache für die hohen detektierten Acetatkonzentrationen sein könnte. Demzufolge ist *C. scatologenes* ein abundanter (10^4 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$) und obligat anaerober Fermentierer im Niedermoor. Diese Beobachtung lässt aber auch vermuten, dass Acetogene trotz relativ saueren pH und niedrigen Temperaturen abundant sind und Acetogenese im Niedermoor stattfindet.

C. acidisoli ist obligat anaerob, säuretolerant, chemoorganotroph und fermentiert Glucose zu Acetat, Butyrat, Lactat, H_2 und CO_2 , wobei auch Formiat unter bestimmten Bedingungen gebildet werden kann (Kuhner et al., 2000). Dass Acetat, Butyrat, Lactat, Formiat und H_2 in anoxischen Anreicherungen mit Cellulose-haltigem Medium detektiert wurden, aus der die 16S rRNA Gensequenz von *C. acidisoli* stammte, impliziert, dass vermutlich Cellulose oder das aus Cellulose hervorgehende Monomer Glucose von *C. acidisoli* zu den genannten Fermentationsprodukten vergärt wurde. Deshalb ist *C. acidisoli* ein weiterer abundanter (10^4 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$) und obligat anaerober Fermentierer im Niedermoor.

Zusammenfassend zeigten die kultivierungsabhängigen Methoden, dass phylogenetisch diverse, fakultativ aerobe und obligat anaerobe, potentielle Fermentierer innerhalb der *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria*, *Pseudomonadaceae*, *Bacteroidetes* und *Clostridia* im Niedermoor abundant sind,

zahlreiche organische Verbindungen vergären und somit eine bedeutende Rolle im „intermediary ecosystem metabolism“ (d. h., im Metabolismus, der zu Methanogenese führt) des Niedermoores spielen.

4.2. Aktive Monosaccharid- abbauende, anaerobe Prokaryoten

Obwohl der 16S rRNA Gen Pool von einigen sauren Mooren bereits evaluiert wurde (Dedysh et al., 2006; Kraigher et al., 2006, Hunter et al., 2006), ist wenig über die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft von aktiven Fermentieren, die am Kohlenstofffluss des Niedermoores beteiligt sind, bekannt. Da Fermentierer keine monophyletische Gruppe bilden, kann man diese nicht allein basierend auf 16S rRNA Gensequenzen identifizieren. Obwohl Methanogene bereits durch 16S rRNA Genanalyse und Methyl-Coenzym M-Reduktase-Alpha-Untereinheit (*mcrA*) Analyse (z. B. Galand et al., 2002 & 2005; Horn et al., 2003) in einigen sauren Mooren detektiert wurden, konnte der aktive Anteil dieser Methanogenen noch nicht identifiziert werden. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit mit 16S rRNA SIP (3.3.) und direkter 16S rRNA Genanalyse (3.4.) Xylose- und Glucose-verwertende Fermentierer, und aktive gemäßigt säuretolerante *Archaea* in diesem Niedermoor identifiziert.

Die meisten phylogenetischen Gruppen, die durch RNA-SIP (Abbildung 3.13, Tabelle 3.4) detektiert wurden, sind in Mooregebieten weit verbreitet (z. B. Dedysh et al., 2006; Hunter et al., 2006; Kraigher et al., 2006). *Acidobacteria* machten 23%, *Deltaproteobacteria* 17% und *Alphaproteobacteria* 16% der detektierten 16S rRNA Gensequenzen aus Boden des Ljubljana Moores (Slowenien) aus und es wurde vermutet, dass diese Gruppen dort die höchste Abundanz besitzen (Kraigher et al., 2006). Die Hauptgruppen der 16S rRNA Gensequenzen, die aus einem sauren *Sphagnum*-Moor (pH 3.9-4.5) im Westen Sibiriens stammten, wurden *Acidobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* und *Deltaproteobacteria* zugewiesen (Dedysh et al., 2006). In einer aktuellen Studie wurde mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) die Populationsgröße der *Acidobacteria* in einem sauren *Sphagnum*-Moor im Norden Russlands abgeschätzt (Pankratov et al., 2008). Die Zellzahlen lagen zwischen 0.4×10^6 und 1.3×10^7 Zellen pro Gramm

feuchten Moorboden (Pankratov et al., 2008), wobei die *Acidobacteria* ca. 4% der gesamten Bakterienzellzahl ausmachten (Pankratov et al., 2008). Dies sind eindeutige Hinweise für die Abundanz von *Acidobacteria* in Moorlandschaften. Tatsächlich waren viele 16S rRNA Gensequenzen, die durch RNA-SIP und direkter 16S rRNA Genanalyse detektiert den *Acidobacteria* zugehörig (Abbildung 3.13 und 3.14, Tabelle 3.4). Trotzdem ist immer noch wenig über deren Funktion im Kohlenstofffluss in Feuchtgebieten bekannt. Der nächste kultivierte Verwandte (basierend auf 16S rRNA Genähnlichkeiten) der in dieser Studie detektierten *Acidobacteria* Sequenzen war *Acidobacterium capsulatum*, ein Organismus, der Xylose und Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle bei mäßig saurem pH (3-6) nutzen kann, aber nur aerob wächst (Kishimoto et al., 1991). Die relative Abundanz eines 266 bp langen T-RFs, das indikativ für *Acidobacterium* war, nahm in der „schweren“ RNA während der Inkubation des Moorbodens mit ^{13}C -Xylose zu (Tabelle 3.4, Abbildung 3.13). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bestimmte *Acidobacteriaceae*-Arten zumindest für 13 Tage überlebten und/oder Xylose unter anoxischen Bedingungen nutzten. Auch in einer anderen Studie gibt es Hinweise, dass in Mooren anaerobe Arten innerhalb der *Acidobacteria* vorkommen (Pankratov et al, 2008).

Innerhalb der *Alphaproteobacteria* nahm wie bereits genauer beschrieben (4.1.) die relative Abundanz des T-RFs, das indikativ für die Familie *Rhodospirillaceae* war (440 bp, Tabelle 3.4, Abbildung 3.13), mit fortschreitender Inkubation sowohl im ^{13}C -Xylose- als auch im ^{13}C -Glucose- Experiment zu, was darauf hindeutet, dass Mitglieder der *Rhodospirillaceae* in anoxischen Bodenaufschlammungen aktiv am Kohlenstofffluss zu CH_4 beteiligt waren, in dem sie vermutlich Xylose und Glucose vergärten.

Die relative Abundanz von *Actinomycetes*- verwandten T-RFs (140 bp; Tabelle 3.4, Abbildung 3.13) ist konsistent mit dem Vorkommen von anaeroben und fakultativen *Actinomycetes* Arten (Garrity & Holt, 2005). Andere bekannte Genera, die die Fähigkeit zu Hexose- und/oder Pentose- Fermentation besitzen, inkludieren *Acidaminococcaceae* (obligate Anaerobier), *Aeromonadaceae* (fakultative Aerobier), *Clostridiaceae* (obligate Anaerobier) und *Enterobacteriaceae* (fakultative Aerobier) (Garrity & Holt, 2005). 16S rRNA Gensequenzen, die indikativ für diese Familien waren, wurden mit RNA-SIP detektiert (Tabelle 3.4, Abbildung 3.13). Einige Arten der

Familie *Acidaminococcaceae* können Glucose vergären und Acetat produzieren (Kane & Breznak, 1991; Drake et al., 2006). Zum Beispiel baut das acetogene Bakterium *Acetonema longum* Glucose stöchiometrisch zu Acetat über den Acetyl-CoA Stoffwechselweg um (Kane & Breznak, 1991; Drake et al., 2006). 16S rRNA Gensequenzen, die aus der „schweren“ RNA des ^{13}C -Glucose-Experiments stammten, wurden *A. longum* zugeordnet, und T-RFs die indikativ für diese Sequenzen waren, besaßen eine höhere relative Abundanz zum späten Probenahmezeitpunkt (Abbildung 3.13). Diese Beobachtung zeigt, dass Mitglieder der Familie *Acidaminococcaceae* wahrscheinlich im Glucose-Metabolismus in anoxischen Bodenaufschlammungen involviert sind. Keine der *A. longum*-zugeordneten Sequenzen stammte von „schwerer“ RNA aus dem ^{13}C -Xylose Experiment (Abbildung 3.13). Diese Beobachtung stimmt mit der Tatsache überein, dass *A. longum* Xylose nicht nutzen kann (Kane & Breznak, 1991).

Die meisten der 16S rRNA Gensequenzen, die in der „schweren“ RNA des ^{13}C - Xylose und ^{13}C -Glucose Experiments detektiert wurden, fielen zur Gattung *Clostridium*. Durch kultivierungsabhängige Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Clostridien im Niedermoor abundante Fermentierer sind (4.1.). Clostridien können unter anderem Acetat, Butyrat und H_2/CO_2 aus Glucose und Xylose produzieren (Drake & Küsel, 2005) und kommen in sauren Hochmooren vor (z. B. Kuhner et al., 2000). Diese Beobachtung lässt sich mit den in Monosaccharid-supplementierten Inkubationen beobachteten Gärungsprodukten (Abbildung 3.6) und mit den in der „schweren“ RNA hohen relativen Abundanzen der T-RFs, die indikativ für *Clostridia* waren, vereinbaren (520 bp; Abbildung 3.13). Ein signifikanter Drift der Clostridien- ^{12}C -RNA Moleküle in die „schweren“ Fraktionen ist sehr unwahrscheinlich, da Clostridien einen relativ niedrigen G+C Gehalt besitzen (Drake & Küsel, 2005).

Produkte, die charakteristisch für gemischte Säurefermentation und eine Buttersäurefermentation sind, wie Formiat, Acetat, Butyrat, CO_2 und H_2 , wurden in Moorbodenaufschlammungen mit Xylose und Glucose detektiert. *Shigella*- und *Tolomonas*- verwandte RNA wurde mit ^{13}C -Xylose und ^{13}C -Glucose markiert (Abbildung 3.13, Tabelle 3.4), was darauf hindeutet, dass die Monosaccharide von diesen Organismen in anoxischen Bodenaufschlammungen degradiert wurden. *S. sonnei* ist zur gemischten Säurefermentation fähig (4.1.; Brenner et al., 2005a).

Formiat, Acetat und Ethanol sind Fermentationsprodukte von *T. auensis*, das eine fakultative Art innerhalb der *Aeromonadaceae* ist (Brenner et al., 2005a). T-RF 150 bp, das indikativ für *Sphingomonadaceae* war, besaß eine hohe relative Abundanz in den ¹³C-RNA-dominierenden Fraktionen des Xylose- und Glucose-Experiments zum frühen Probenahmezeitpunkt (Abbildung 3.13). Der nächste kultivierte Verwandte (basierend auf 16S rRNA Genähnlichkeit) der detektierten *Sphingomonadaceae*-zugehörigen Sequenzen, war *Sphingomonas echinoides* (95% Ähnlichkeit; Tabelle 3.4), was darauf hindeutet, dass ein potentiell neues Gattung der *Sphingomonadaceae* detektiert wurde. Arten von *Sphingomonas* wachsen auf Monosacchariden (z. B. Xylose und Glucose) unter oxischen Bedingungen (Brenner et al., 2005b), und eine Gattung innerhalb der *Sphingomonadaceae* (*Zymomonas* sp.) vergärt Monosaccharide (z. B. Glucose; Brenner et al., 2005b). Deshalb kann man vermuten, dass neue Arten von dieser Familie von Xylose und Glucose abstammenden Kohlenstoff in anoxischen Bodenaufschlammungen assimilierten.

T-RFs, die indikativ für *Syntrophobacteraceae* (166 bp) waren, besaßen am Tag 13 eine höhere relative Abundanz als am Tag 4 des ¹³C-Xylose-Experiments (Abbildung 3.12). 16S rRNA Gensequenzen wurden *Syntrophobacter wolinii* (96% Sequenzähnlichkeit) zugeordnet. Mitglieder der Familie *Syntrophobacteraceae* sind obligat anaerobe Syntrophe. Sie können durch den Abbau von Propionat, Lactat und Propanol in Anwesenheit eines syntrophen Partners, wie einen Methanogenen, Energie konservieren (Brenner et al., 2005b). Sie nutzen keine Zucker (Brenner et al., 2005b). Daraus kann man schließen, dass Mitglieder der Familie *Syntrophobacteraceae* vermutlich sekundär durch den weiteren Abbau von Fermentationsprodukten aus Xylose markiert wurden. Diese Beobachtung gibt Grund zur Annahme, dass Syntrophe in anoxischen Moorbodenaufschlammungen primäre Fermentationsprodukte abbauten und mit aktiven säure-toleranten Methanogenen eine mutualistische Beziehung in Form eines Interspezies-H₂-Transfers eingingen.

Dass 16S rRNA von *Methanobacteriaceae*, *Methanosarcinaceae* und *Crenarchaeota* zu Tag 13 in dem ¹³C-Xylose Experiment detektiert wurde (Abbildung 3.15), deutet darauf hin, dass aktive säuretolerante Methanogene und *Crenarchaeota* in anoxischen Bodenaufschlammungen vorkamen. DNA und nicht RNA von *Methanobacteriaceae* oder *Methanosarcinaceae* wurde ebenfalls in anderen Studien über Feuchtgebiete detektiert (z. B. Cadillo-Quiroz et al., 2006;

Horn et al., 2003; Kotsyurbenko et al., 2004). Da die Mitglieder der Familie *Methanosarcinaceae* Acetat zu CH₄ reduzieren (Boone et al., 1993), kann man daraus schließen, dass vermutlich ein Nettoverbrauch von Acetat während des ¹³C-Xylose-Experiments stattfand. Dass Mitglieder der Familie *Methanobacteriaceae* Formiat und H₂/CO₂ zu CH₄ reduzieren (Boone et al., 1993), gibt Grund zur Annahme, dass diese für den detektierten Formiatverbrauch verantwortlich waren. Die Kenntnisse über die Physiologie von mesophilen *Crenarchaeota* ist nicht vollständig, da bisher nur ein einziges mesophiles Crenarchaeen-Isolat (aerober, autotropher Ammoniumoxidierer) kultiviert wurde (Könneke et al., 2005). Die Detektion der RNA von *Crenarchaeota* Gruppe 1.3 in Bodenaufschlammungen nach 13 Tagen anoxischer Inkubation (Abbildung 3.15) geht mit der Tatsache einher, dass diese Crenarchaeen-Gruppe in anoxischen Habitaten weit verbreitet ist (z. B. geflutete Böden und Sedimente; Nicol & Schleper, 2006) und zeigt, dass Mitglieder dieser Crenarchaeen-Gruppe fähig zu anaeroben Wachstum sind.

4.3. Einfluss von Ethanol, Xylose und Glucose auf den anaeroben Kohlenstofffluss

Moore sind heterogene, anoxische Ökosysteme, die einen vernachlässigbaren Anteil an alternativen Elektronenakzeptoren außer CO₂ aufweisen (z. B. Horn et al., 2003, Paul et al., 2006). Deshalb wird in diesen Ökosystemen Kohlenstoff hauptsächlich über Fermentation zu organischen Säuren, Alkoholen und CO₂ abgebaut. Diese Verbindungen fungieren als Substrate für Methanogene und werden zu CH₄ reduziert. *In situ* CH₄-Emissionen von ca. 530 µmol CH₄ m⁻² h⁻¹ (S. Goldberg, K.-H. Knorr, G. Gebauer, persönliche Mitteilung) zeigen, dass Methanogenese und Methanogenese-antreibende Prozesse wie Fermentation relevant in diesem Niedermoor sind. Andere Studien über den Untersuchungsstandort Schläppnerbrunnen zeigten, dass wenig alternative Elektronenakzeptoren vorhanden sind (Schmalenberger et al., 2007; Paul et al., 2006) und somit Fermentation und Methanogenese bedeutende mikrobielle Prozesse in dem gemäßigt sauren Niedermoor sind.

In Mooren besteht organisches Material zu 20 bis 50% aus Lignin und aus Lignin-gewonnenen Substanzen, z. B. Lignocellulose (Trckova et al., 2005). Man

kann daher davon ausgehen, dass Xylose und Glucose mittels Hydrolyse der Lignocellulose-Bestandteile Xylan und Cellulose durch extrazelluläre Enzyme primärer Fermentierer, abgebaut wurden (Ahmed et al., 2001; Kotsyurbenko, 2005). Deshalb sind Xylose und Glucose Zwischenprodukte im „intermediary ecosystem metabolism“ eines methanogenen Moores, die von Fermentieren zu organischen Säuren (z. B. Acetat), Alkohole (z. B. Ethanol), CO_2 und H_2 abgebaut werden. Vor allem organische Säuren und Alkohole (z. B. Ethanol) werden von sekundären Fermentieren (Syntrophen) noch weiter abgebaut. Syntrophe gehen mit Methanogenen einen Interspezies- H_2 /Formiat-Transfer ein und begünstigen dadurch deren Wachstum. Acetat und H_2/CO_2 sind die hauptsächlichen Substrate für Methanogenese, was auch schon in anderen Mooren belegt wurde (Conrad, 1999; McInerney & Bryant, 1980; Westermann, 1993; Williams & Crawford, 1984). Daher kann man Fermentation als Voraussetzung für CH_4 -Produktion bezeichnen.

Da anoxische Moorbodenaufschlammungen ohne Substrat im Vergleich zu anderen sauren Mooren aus der gleichen Gegend im Fichtelgebirge ähnliche Mengen an CH_4 produzierten ($0.3 - 1.7 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{d}^{-1}$; 3.2.; Horn et al., 2003), kann man davon ausgehen, dass Methanogenese in dem Niedermoor stattfindet. Die Detektion von organischen Säuren (z. B. Acetat, Butyrat) und CO_2 in anoxischen Bodenaufschlammungen ohne Substrat zeigte, dass Gärung im Moorboden aktiv war (3.2.). Eine Substratzugabe (Ethanol, Xylose und Glucose) stimulierte die Bildung von Fermentationsprodukten (z. B. Acetat, Butyrat, CO_2 , H_2) und CH_4 (3.2.). Die Substrat-induzierte Stimulation der Bildung organischer Säuren und CH_4 eines Moorbodens wurde bereits in anderen Studien beobachtet (z. B. Wüst et al., 2008; Horn et al., 2003), was weitere Hinweise sind, dass das Wachstum von Fermentierern und demzufolge Methanogenen durch Substratzugabe begünstigt wird.

In dem Inkubationsexperiment mit Xylose- und Glucose- waren die Hauptfermentationsprodukte Acetat, Butyrat, Propionat und CO_2 (3.2.3.), welche charakteristisch für gemischte Säurefermentation sind. Das wichtigste Hauptprodukt war Acetat, was darauf hindeutet, dass vermutlich Acetat zugleich über Acetogenese in anoxischen Bodenaufschlammungen gebildet worden war. Hinweise für eine in Mooren ablaufende Acetogenese geben auch andere Studien (z. B. Horn et al., 2003; Wüst et al., 2008). Bei dem Xylose- und Glucose- Experiment ging die

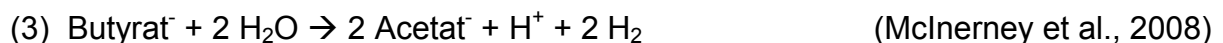
vorübergehende Produktion und der spätere Verbrauch von Formiat mit der Akkumulation von CH₄ einher (Abbildung 3.6), was darauf hindeutet, dass Formiat ein Vorläufer von CH₄ war. Diese Schlussfolgerung wird durch eine ähnliche Beobachtung beim Ethanol- Experiment unterstützt, worin der Verbrauch von Formiat ebenfalls mit der Akkumulation von CH₄ einherging (Abbildung 3.5). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen einer anderen Studie über dieses Niedermoor überein, wonach durch die Zugabe von Formiat die CH₄ Bildung in anoxischen Moorbodenaufschlammungen stimuliert wurde (Wüst, 2006). Diese Ergebnisse zeigen, dass Fermentationsprozesse und Methanogenese in anoxischen Bodenaufschlammungen aktiv und trophisch verlinkt waren, was auch in einer anderen Studie über dieses Moor beobachtet wurde (Wüst, 2006).

Während des Ethanol-Experiments ging der Verbrauch von Ethanol mit der Bildung von Butyrat und H₂ einher, wobei Acetat- und CO₂-Konzentrationen relativ mäßig anstiegen (3.2.2.). Aus dieser Beobachtung kann man schließen, dass durch die Zugabe von Ethanol dessen Fermentation begünstigt wurde. Am 15. Inkubationstag waren die Konzentrationen von Butyrat höher als die von Acetat. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass zunächst primäre Ethanol- oder Capronsäure-Fermentation durch bestimmte Clostridien-Arten (z. B. *Clostridium klyveri*; Thauer et al., 1968) stattgefunden hatte. Zu t₀ waren ca. 0,5 mM Acetat und 0,1 mM CO₂ in den Bodenaufschlammungen mit Ethanol vorhanden, was zeigt, dass Ethanol- und/oder Capronsäure-Fermentation möglich war. Tatsächlich wurde zu Tag 15 Capronsäure bis zu ca. 150 µM in anoxischen Bodenaufschlammungen mit Ethanol detektiert (Daten nicht gezeigt). Kultivierungsabhängige Analysen und SIP zeigten zudem, dass Clostridien im Niedermoor abundant und aktiv sind (3.1. und 3.3.). Ethanol kann aber auch von Syntrophen nach folgender Reaktion (2) abgebaut werden:



Diese Reaktion kann unter Standardbedingungen nur ablaufen, wenn der H₂-Partialdruck niedrig gehalten wird. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass trotzdem ein Ablaufen der Reaktion unter den eingestellten Versuchsbedingungen z. B. durch Substratüberschuss möglich war. Das Vorkommen von aktiven Syntrophen im Niedermoor wurde durch 16S rRNA SIP belegt (3.3.). Vermutlich war jedoch die

Oxidation von Ethanol durch Syntrophe zu Inkubationsbeginn innerhalb von 15 d kein dominierender Prozess in anoxischen Moorbodenaufschlammungen, da zunächst nicht Acetat sondern Butyrat Hauptprodukt war. Nach 15 Inkubationstagen und erneuter Zugabe von ca. 0,5 mM Ethanol nahm die Butyrat-Produktion ab und Acetat und CO₂ akkumulierten (3.2.1.). H₂-Konzentrationen stiegen bis zu 50 µM an und wurden wieder verbraucht (Abbildungen 3.4 und 3.5). Basierend auf diesen Beobachtungen kann man vermuten, dass vermutlich Butyrat durch Syntrophe nach folgender Reaktion (3) in anoxischen Bodenaufschlammungen abgebaut wurde:



Diese Reaktion ist ebenfalls unter Standardbedingungen endergon und kann nur Ablaufen, wenn der H₂-Partialdruck niedrig gehalten wird. Dies erfolgt unter anderem durch Methanogene (McInerney et al., 2008). Ein starker Anstieg der CH₄ Konzentrationen ab Tag 15 in den Bodenaufschlammungen mit Ethanol deutet darauf hin, dass Methanogenese stattfand und sich eine methanogene Population in den Bodenaufschlammungen mit Ethanol entwickelt haben könnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass vermutlich das Wachstum von Clostridien und Syntrophen durch Ethanol stimuliert wurde und ein Interspezies-H₂-Transfer zwischen Syntrophen und Methanogenen in anoxischen Bodenaufschlammungen mit Ethanol stattgefunden hatte.

Basierend auf den Ergebnissen über die am Kohlenstofffluss aktiv beteiligten Prokaryoten durch 16S rRNA SIP (3.3.) und den Inkubationen mit Ethanol, Xylose und Glucose (3.2.) wurde ein hypothetisches Modell erstellt (Abbildung 4.1). Im Niedermoor vorkommende Polymere (z. B. Lignocellulose) werden unter anoxischen Bedingungen von hydrolytischen Enzymen, die u. a. von Mitgliedern der *Actinomycetales* stammen können zu Monomeren (z. B. Xylose und Glucose) abgebaut. Diese können von Mitgliedern der *Actinomycetales*, *Acidobacteria*, *Sphingomonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae* sowie *Aeromonadaceae* zu organischen Säuren und Alkoholen vergärt werden können. *Enterobacteriaceae* können Monomere (z. B. Xylose und Glucose) über eine gemischte Säurefermentation zu Acetat, Formiat, CO₂ und H₂ abbauen. Clostridien können durch Buttersäurefermentation für die Bildung von Butyrat, Acetat, CO₂ und H₂ verantwortlich sein. Acetogene innerhalb der Clostridien könnten zudem Glucose über den Acetyl-CoA Weg zu Acetat abgebaut haben. Inwieweit *Acidobacteriaceae*

und *Sphingomonadaceae* an dem anaeroben Abbau von Monosacchariden beteiligt sind, müsste durch kultivierungsabhängige Experimente genauer untersucht werden. Butyrat kann von Mitgliedern der Familie der *Syntrophobacteraceae* weiter zu CO_2 und H_2 abgebaut werden, wobei sie mit Methanogenen einen Interspezies- H_2 -Transfer eingehen können. Das könnten z. B. Mitglieder der hydrogenotrophen methanogenen Familie *Methanobacteriaceae* sein, die CH_4 aus Formiat, CO_2 und H_2 bilden. Das aus Fermentation oder Acetogenese gewonnene Acetat kann von acetoclastischen Methanogenen, wie Mitglieder der Familie *Methanosarcinaceae* zu CH_4 reduziert worden sein.

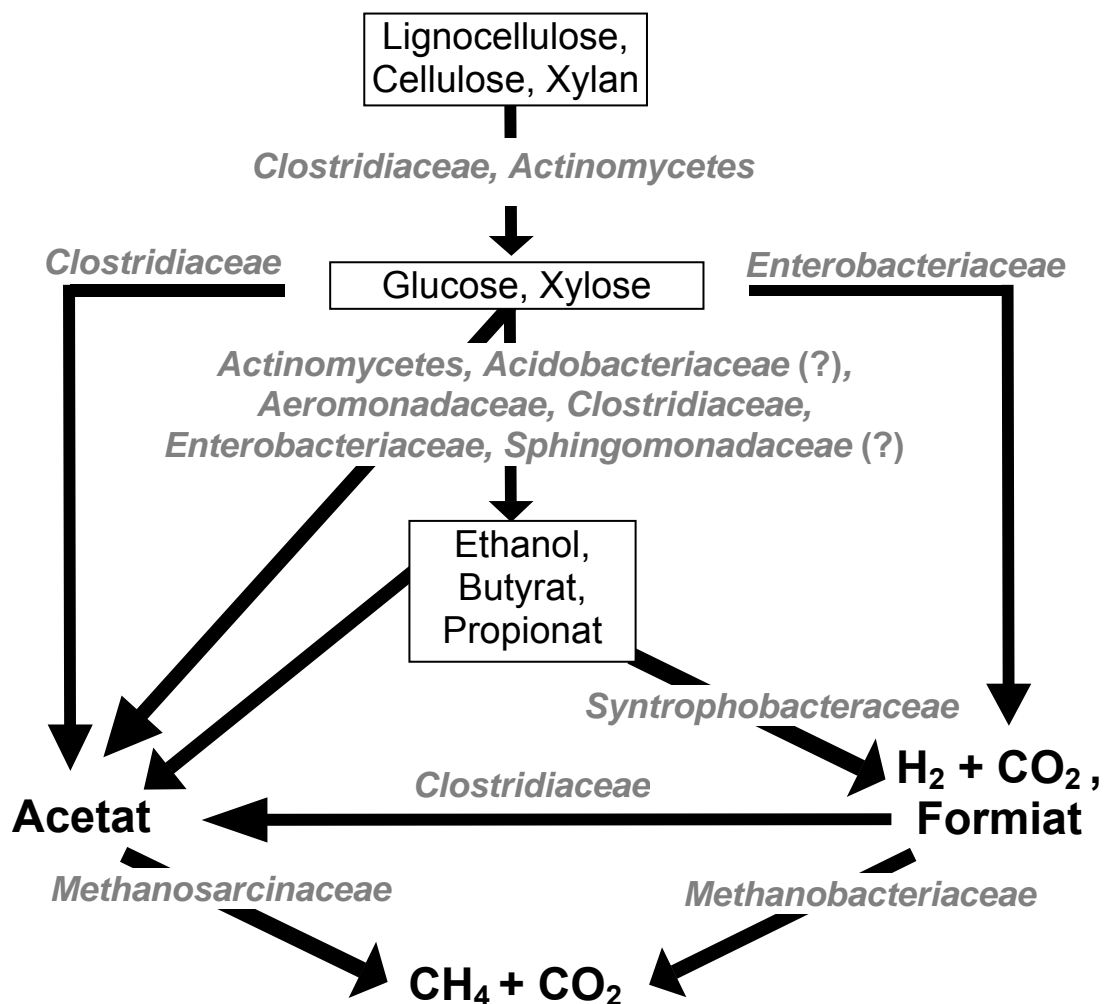


Abbildung 4.1: Vereinfachtes hypothetisches Modell des anaeroben Kohlenstoffflusses und der beteiligten aktiven Prokaryoten im Niedermoor (verändert nach Drake & Küsel, 2003; McInerney & Bryant, 1981). Graue Schrift hebt aktive phylogenetische Gruppen hervor, fett markierte, vergrößerte Schrift beschreibt mögliche Endprodukte.

4.4. Mikrobielle Populationsstrukturen in Abhängigkeit von der Tiefe und Versuchsfläche

Böden werden aufgrund ihrer enormen physikalischen, chemischen und biologischen Heterogenität als mikrobiologisch vielfältigstes Ökosystem bezeichnet (Daniel, 2005). Insbesondere Feuchtgebiete sind temporär und räumlich sehr heterogen (Paul et al., 2006). Umweltbedingungen, wie Nährstoffverfügbarkeit, Wasserstand, pH und Bodentextur regulieren die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft (Hansel et al., 2008, Høj et al., 2005, Galand et al., 2003) und somit die biochemischen Prozesse in Feuchtgebieten (Paul et al., 2006). Diese Faktoren variieren mit der Bodentiefe beträchtlich (Hansel et al., 2008), was auch in dem untersuchten Niedermoor beobachtet wurde (Reiche et al., 2008). In einer anderen Studie zeigten Niedermoore eine räumliche Variabilität der CH₄-Emission, aufgrund von unterschiedlichen methanogenen Populationen an einem Standort (Saarnio et al., 2000). Die Heterogenität der CH₄-Emission wurde auch in einem borealen oligotrophen Niedermoor beobachtet (Galand et al., 2003). Unterschiede der physikalisch-chemischen Bedingungen wirken sich hierbei vor allem auf die CH₄-Vorläufer aus (Hornibrook et al., 1997), die aus dem „intermediary ecosystem metabolism“ hervorgehen. In einer anderen Studie über das Niedermoor wurde durch anoxische Bodeninkubationen gezeigt, dass Substratverfügbarkeit, Temperatur und pH-Werte einen Effekt auf die CO₂- und CH₄-Bildungsaktivität hatten (Wüst, 2006). Außerdem variierten CO₂- und CH₄-Bildungsaktivität mit der Tiefe (Wüst, 2006). Dies sind Hinweise, dass die Aktivität der Fermentierer- und Methanogenen-Populationen in dem Niedermoor stark von physikalisch-chemischen Parametern beeinflusst wird.

Aufgrund der großen räumlichen Heterogenität der biochemischen Parameter im untersuchten Niedermoor, wurde daher angenommen, dass die dadurch beeinflusste mikrobielle Gemeinschaft ebenfalls räumlich heterogen ist. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die räumliche Distribution und Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft (*Bacteria* und *Archaea*) der sechs unterschiedlichen Flächen (A4-A6 und K4-K6) und von vier Tiefenzonen (0-10, 10-20, 20-30, 30-40 cm) innerhalb des Niedermoors untersucht, um die Heterogenität der mikrobiellen Gemeinschaft im Niedermoor zu erfassen.

Die in 16S rRNA Genbibliotheken detektierte Diversität innerhalb der Domäne *Bacteria* war größer als die innerhalb der *Archaea* (Abbildung 3.19). Diese Beobachtung wurde auch von anderen Studien über die mikrobielle Diversität von Bodenprofilen festgestellt (z. B. Hansel et al., 2008). Rarefaction Analysen zeigten, dass ca. 55 unterschiedliche Bakterien-Arten und 20 unterschiedliche Archaeen-Arten im Niedermoor auftraten (Abbildung 3.19 A). Jedoch kann man nicht davon ausgehen, dass diese Zahlen *in situ* relevant sind, da die RFLP-Analyse die Anzahl der verschiedenen Spezies unterschätzt. Ein Grund dafür wären gleich lokalisierte Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme auf den geklonten 16S rRNA Gensequenzen, so dass beim Verdau gleiche Fragmente hervorgingen, die bei der Gelelektrophorese als gleiche Bandenmuster identifiziert wurden. Daher repräsentiert eine OTU vermutlich mehrere Spezies. 16S rRNA Genbibliotheken verschiedener Probenahmestandorte und Tiefenzonen (Daten nicht gezeigt) deuteten darauf hin, dass die Diversität innerhalb der *Bacteria* und *Archaea* räumlich nicht signifikant unterschiedlich war (Abbildung 3.19).

Jedoch zeigten Fingerprinting-Analysen (DGGE, T-RFLP; Abbildungen 3.17 und 3.20), dass sich die Bakterien- und Archaeen- Gemeinschaft in diesem Moor voneinander unterscheidet und räumlich heterogen ist (3.4.3.). Diese Beobachtung stimmt mit anderen Studien überein, die mikrobielle Gemeinschaften entlang eines Tiefenprofils in Feuchtgebieten untersucht haben (z. B. Jaatinen et al., 2007; Juottonen et al., 2005; Galand et al., 2003). Im untersuchten Niedermoor zeigte die mit DGGE detektierte Bakterien-Population eine größere Heterogenität über die verschiedenen Probenahmestandorte als über die Tiefe (Abbildung 3.18 A). Studien über die Populationsstruktur in einem Schwermetall-haltigen Boden konnten ebenfalls keinen Bezug von auftretenden DGGE-Banden zu einer bestimmten Tiefe feststellen (Becker et al., 2006). Dedysh et al. (2006) untersuchten die Population der *Bacteria* in einem sauren Moorboden anhand der kultivierungsunabhängigen Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und detektierten ebenfalls keine tiefenabhängige Verteilung der Bakterien-Population (außer für *Planctomycetes*) innerhalb von 0-40 cm Tiefe.

Im Gegensatz dazu wies die mit DGGE detektierte Archaeen-Population eine geringere Heterogenität über die verschiedenen Probenahmestandorte als über die Tiefe auf (Abbildung 3.18 B). Die Diversität der methanogenen *Archaea* in

Abhängigkeit von der Tiefe wurde in einem Finnischen oligotrophen Niedermoor mittels Methyl-Coenzym M Reduktase α -Untereinheit Analyse untersucht (Galand et al., 2002). Mittels RFLP- und DGGE-Profilen wurde eine Veränderung der methanogenen Population mit der Tiefe detektiert, wobei vermutet wurde, dass die Ausbildung einer komplexeren Population im oberen Moorboden aufgrund eines breiteren Spektrums an verfügbaren Kohlenstoffquellen zurückzuführen ist (Juottonen et al., 2005; Galand et al., 2003; Galand et al., 2002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bakterien- und Archaeen-Population von unterschiedlichen physikalisch-chemischen Faktoren beeinflusst werden. Vermutlich werden Bakterien hauptsächlich durch sich räumlich horizontal verändernde Faktoren wie Vegetation beeinflusst. Archaeen könnten vielmehr durch verfügbare Kohlenstoffquellen, die mit der Tiefe im Niedermoor abnehmen (Wüst, 2006), beeinflusst werden. Jedoch wurde kein signifikanter Unterschied der Bakterien- und Archaeen-Diversität innerhalb der Flächen und Tiefen detektiert, was anzunehmen lässt, dass vor allem Abundanz, Aktivität (Wüst, 2006) durch im Niedermoor auftretende instabile physikalisch-chemische Parameter beeinflusst werden.

Bacteria- und *Archaea*- T-RFLP Profile der vier Tiefenzonen (Versuchsflächen gemittelt) wurden identifiziert (Abbildung 3.20), wobei sich basierend auf den identifizierten T-RFs scheinbar die Bakterien-Population mit der Tiefe mehr unterscheidet als die Archaeen-Population. Jedoch konnten nur sehr wenige T-RFs der Archaeen- T-RFLP-Profile im Vergleich zu den T-RFs der Bakterien- T-RFLP-Profile identifiziert werden (Abbildung 3.20 und Tabelle 3.5). Deshalb ist ein Vergleich der Bakterien- und Archaeen-Populationsstruktur bezüglich der angewendeten T-RFLP-Analyse nicht tragbar.

4.5. Hypothetisches Modell über die Tiefenzonierung detektierter Prokaryoten

Das hypothetische Modell zeigt die in dieser Arbeit detektierten Prokaryoten, deren Verteilung über die Tiefe und mögliche Struktur-Funktionsbeziehungen (Abbildung 4.2). In der Tiefe 0-10 cm wurden Mitglieder von *Burkholderiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Nitrosomonadales*, *Cyanobacteria*, *Myxococcales* und *Hydrogenophilaceae* detektiert (3.1., Abbildung 3.20, Tabelle 3.5). Einige Arten von

Nitrosomonadales können Ammonium zu Nitrit oxidieren (Brenner et al., 2005b), das wiederum von anderen Bakterien zu Nitrat oxidiert werden kann. In dem untersuchten Niedermoor wurden Nitrat Konzentrationen von ungefähr 50 μM in 0-10 cm Tiefe gemessen (Schmalenberger et al., 2007), was darauf hindeutet, dass ein N-Umsatz im Niedermoor stattfindet und somit *Nitrosomonadales*- Arten im N-Kreislauf des Moores involviert sein können. *Myxococcales* sind fakultativ anaerob und können Polymere (z. B. Cellulose) durch extrazelluläre hydrolytische Enzyme degradieren (Garrity & Holt, 2001). Ihr Vorkommen könnte eine bedeutende Rolle im Abbau von Polymeren im Moor spielen und somit die Substratzugänglichkeit für Monomer-abbauende Mikroorganismen begünstigen. Zudem wurde durch 16S rRNA SIP gezeigt, dass Mitglieder der *Actinomyces* in anoxischen Bodenaufschlammungen aktiv Monosaccharide abbauen (4.2). Detektierte 16S rRNA Gensequenzen wurden *Thiobacillus denitrificans* innerhalb der *Hydrogenophilaceae* zugeordnet (Tabelle 3.2). *Thiobacillus* spp. sind obligate oder fakultative Aerobier bzw. Denitrifikanten und können schwefelhaltige Verbindungen oxidieren (Brenner et al., 2005b). In einer anderen Studie über dieses Moor wurden geringe Mengen an Sulfat (80-300 μM) gemessen (Schmalenberger et al., 2007). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass abhängig von O_2 -Konzentrationen *Thiobacillus* spp. unter oxischen Bedingungen involviert im S-Kreislauf durch Oxidation von schwefelhaltigen Verbindungen zu z. B. Sulfat sind oder unter anoxischen Bedingungen denitrifizieren.

In 0 bis 20 cm Tiefe wurden Mitglieder von *Rhodospirillaceae* und *Acidobacteriaceae* detektiert (Abbildungen 3.20). Detektierte 16S rRNA Gensequenzen wurden *Skermanella parooense* innerhalb der *Rhodospirillaceae* zugeordnet (Tabelle 3.5). Mitglieder der *Rhodospirillaceae* sind im Moor mit bis zu 10^4 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ abundant und können in anoxischen Bodenaufschlammungen Glucose und Xylose abbauen (3.1. und 3.3.2.). Durch 16S rRNA SIP zeigte sich, dass Mitglieder der *Acidobacteriaceae* unter anoxischen Bedingungen mehr als 13 Tage überleben können bzw. sogar Monomere wie Xylose und Glucose nutzen (Abbildung 3.13), was darauf hindeutet, dass sie im anaeroben Kohlenstofffluss dieses Moores involviert sind.

Mitglieder der Familie *Clostridiaceae* sind im Moor mit bis zu 10^4 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ abundant (Tabelle 3.2) und kamen in 0 bis 20 cm und 30 bis 40 cm Tiefe vor (Abbildungen 3.20 und 4.2). Die Familie *Clostridiaceae* kann verschiedene Polymere

(z. B. Cellulose) und auch Monomere über die Butanol-, Buttersäure-, oder Capronsäurefermentation (Dürre, 2005b) vergären. Anoxische Anreicherungen von Moorbodenmikroorganismen zeigten, dass vor allem Cellulose als Substrat von Arten der Familie *Clostridiaceae* genutzt wurde (Tabellen 3.1 und 3.2). Fermentationsprodukte der Clostridien sind z. B. Butyrat, Acetat, CO₂ und H₂ (Dürre, 2005b).

Die Familie *Syntrophaceae* wurde in 10 bis 40 cm Tiefe detektiert. Diese Gruppe kann z. B. Butyrat nutzen, das aus der Buttersäure- oder Capronsäurefermentation der *Clostridiaceae* stammen könnte (Brenner et al., 2005b). Die Familie *Syntrophaceae* kann H₂ zu Methanogenen transferieren (z. B. *Methanobacteriaceae*; Brenner et al., 2005b), was darauf hindeutet, dass aus Fermentation stammende Verbindungen das Wachstum von Syntrophen favorisiert und dadurch zugleich die Bedingungen für das Wachstum von Methanogenen begünstigt wird. Hinweise darüber, dass Fermentationsprozesse und Methanogenese im Niedermoor verknüpft sind, lieferten auch 16S rRNA SIP und supplementierte, anoxische Bodeninkubationen.

Die Familien *Neisseriaceae* und *Enterobacteriaceae* wurden in 20 bis 30 cm Tiefe detektiert und sind bis zu 10⁵ Zellen g_{TG}⁻¹ im Niedermoor abundant (Abbildungen 3.20 und 4.2; Tabelle 3.2). Beide Familien sind fakultativ und degradieren verschiedene Monomere (z. B. Xylose, Glucose) über gemischte Säurefermentation (Brenner et al., 2005a). Fermentationsprodukte sind z. B. Formiat, CO₂ und H₂. Diese Verbindungen können u. a. hydrogenotrophe Methanogene, wie z. B. *Methanobacteriaceae*, als Substrat nutzen (Boone et al., 1993).

Methanobacteriaceae sind in sauren Feuchtgebieten weit verbreitet (Kotsyurbenko et al., 2004 und 2007). Es ist wahrscheinlich, dass Mitglieder der Familie *Methanobacteriaceae* die dominierende methanogene Gruppe in sauren Feuchtgebieten sind, die hydrogenotrophe Methanogenese durchführen (Kotsyurbenko et al., 2004 und 2007). Arten der Familie *Methanobacteriaceae* wurden in 10 bis 30 cm Tiefe (Abbildungen 3.20 und 4.2) detektiert, was darauf hindeutet, dass Mitglieder der Familie *Methanobacteriaceae* vor allem verantwortlich für hydrogenotrophe Methanogenese im Niedermoor sein könnten. Dass Formiat ein Vorläufer von CH₄ in dem untersuchten Niedermoor ist, konnte in anoxischen Inkubationen mit Ethanol, Xylose oder Glucose gezeigt werden (3.2.).

Andere detektierte phylogenetische Archaeen-Gruppen waren *Thermoplasmatales* und *Crenarchaeota* Gruppe I.3 und I.1c, die in 10 bis 30 cm Tiefe detektiert wurden (Abbildungen 3.20 und 4.2). Die Mitglieder der Ordnung *Thermoplasmatales* sind aerobe oder anaerobe Thermophile (Itoh, 2003). Jedoch ist es wahrscheinlich, dass eine neue nicht-thermophile, säuretolerante phylogenetische Gruppe detektiert wurde, die verwandt zu *Thermoplasmatales* ist (Tabelle 3.5). Andere Studien zeigten, dass Mitglieder der *Crenarchaeota* weit verbreitet sind und auch in wassergesättigten Ökosystemen, wie Fluss-Sedimenten vorkommen (z. B. Nicol & Schleper, 2006). In einer anderen Studie über das Niedermoor wurden ebenfalls Mitglieder der *Crenarchaeota* Gruppe I.3 und I.1c detektiert (Wüst et al., 2008). Inwiefern jedoch potentiell neue Arten der *Thermoplasmatales* und *Crenarchaeota* in den Kohlenstofffluss im Niedermoor involviert sind, bleibt noch unklar.

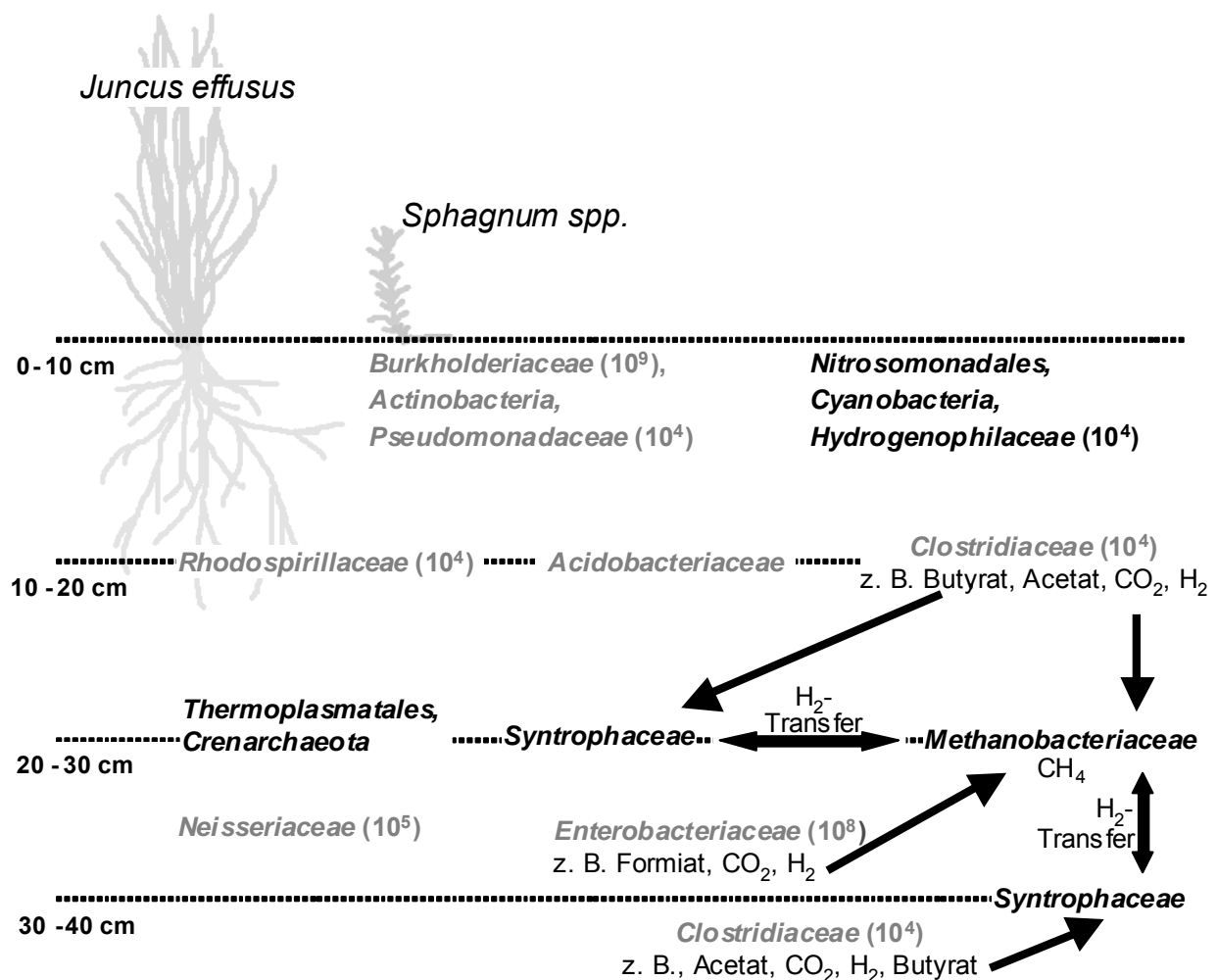


Abbildung 4.2: Hypothetisches Modell über die mikrobielle Populationsstruktur und Funktionsbeziehungen (markiert durch Pfeile) in den Tiefenzonen 0-10, 10-20, 20-30 und 30-

40 cm im Niedermoor. Graue und fette Schrift markiert potentielle Xylose oder/und Glucose-abbauende Mikroorganismen und minimale Zellzahlen (Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$) stehen in Klammern nach der phylogenetischen Zuordnung.

4.6. Vergleich von Methoden zur Erfassung einer mikrobieller Gemeinschaft

In Böden lassen sich mit bislang bekannten Methoden weniger als 1% aller Prokaryoten kultivieren (Amann et al., 1995). Durch Kultivierung werden vor allem schnell wachsende Organismen angereichert, die am besten an das verwendete Kultivierungsmedium angepasst sind (Liesack et al., 1997). Trotz Optimierung der Kultivierungsbedingungen kann bislang eine maximale Kultivierbarkeit von nur etwa 19% erreicht werden (Janssen et al., 2002; Sait et al., 2002). Die direkte 16S rRNA Genanalyse ermöglicht es Limitationen der Kultivierung zu umgehen. Jedoch kann mit dieser Methode keine Aussage über die Funktion der detektierten Mikroorganismen getroffen werden. Zudem muss davon ausgegangen werden, dass die DNA-Extraktion und die anschließende PCR der 16S rRNA Gene die Ergebnisse beeinflussen, da nicht alle Zellen gleich effizient lysiert und nicht jedes DNA-Fragment gleich häufig amplifiziert wird (Liesack et al., 1997). SIP bietet die Möglichkeit in einem Ökosystem vorkommende Mikroben zu identifizieren und deren Funktion zu erfassen (Dumont & Murrell, 2005). Dennoch können mit dieser Methode nur diejenigen Organismen erfasst werden, die das stabile Isotop auch verwerten können. Aufgrund dieser Tatsache wurde zur Erfassung der mikrobiellen Gemeinschaft im Niedermoor eine Kombination aus kultivierungsabhängigen (Anreicherung, Isolierung) und molekularbiologischen Methoden (SIP, direkte 16S rRNA Genanalyse) verwendet. Mit Hilfe dieser Methoden wurde ein großes Spektrum an unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen detektiert (Abbildung 4.3). Jedoch war im Vergleich die Detektierbarkeit dieser Methoden signifikant unterschiedlich, da keine phylogenetische Gruppe von allen gemeinsam detektiert worden war (Abbildung 4.3). Trotz der oben genannten Limitierungen der kultivierungsabhängigen Methoden, konnten acht unterschiedliche phylogenetische Gruppen detektiert werden, wobei drei allein nur durch Kultivierung erfasst wurden. *Rhodospirillaceae* und *Neisseriaceae* wurden sowohl durch Kultivierung als auch

durch direkte 16S rRNA Analyse detektiert, was den Beobachtungen von Felske et al. (1999) widerspricht, worin es keine Korrelation zwischen Kultivierung und 16S rRNA Genanalyse gab.

Die Detektierbarkeit der kultivierungsabhängigen Methoden zeigte auch Übereinstimmungen mit 16S rRNA SIP (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* und *Clostridia*; Abbildung 4.3), was darauf hindeutet, dass es eine Korrelation zwischen der Detektion von abundanten und aktiven Mikroorganismen gab. Mittels direkter 16S rRNA Genanalyse wurden sowohl abundante, als auch aktive phylogenetische Gruppen detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwendung von verschiedenen Methoden unbedingt nötig ist, wenn man eine mikrobielle Gemeinschaft eines Ökosystems evaluieren will.

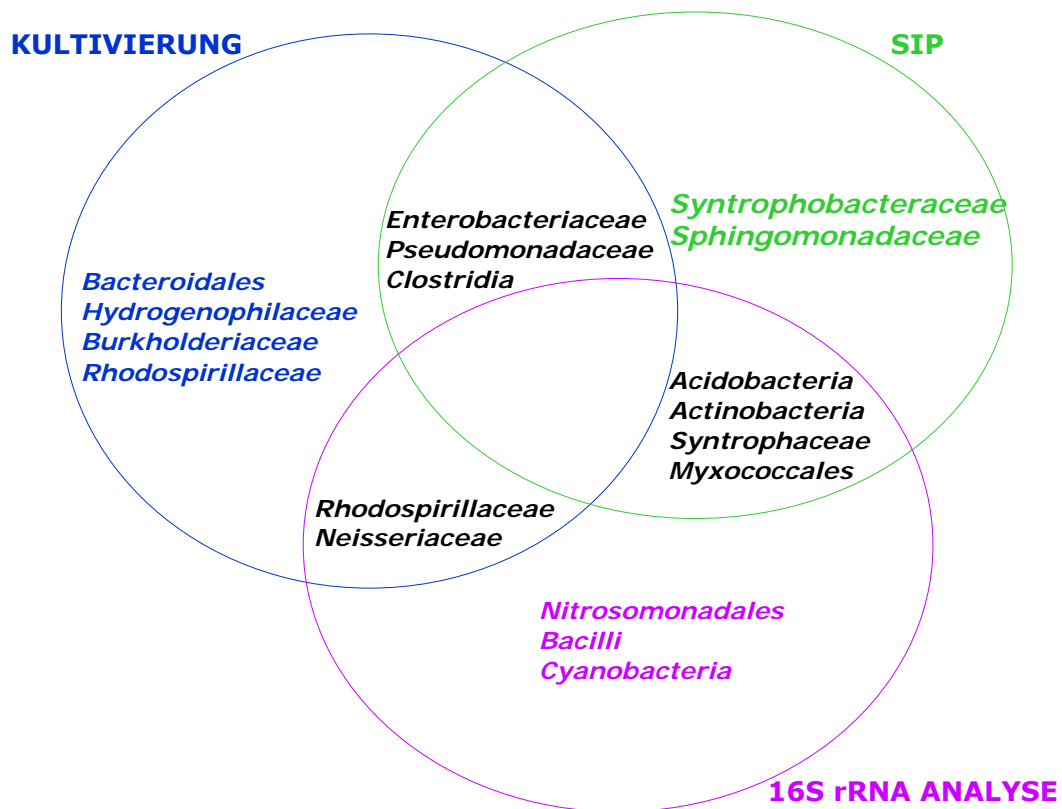


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der durch Kultivierung (blau hervorgehoben), SIP (grün hervorgehoben) und direkter 16S rRNA Genanalyse (violett hervorgehoben) detektierten phylogenetischen Gruppen. Phylogenetische Gruppen innerhalb der Schnittmenge zweier Kreise (schwarz hervorgehoben) veranschaulichen übereinstimmende Ergebnisse der angewandten Methoden.

4.7. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die im Niedermoor am anaeroben Kohlenstofffluss zu CH₄ beteiligte mikrobielle Gemeinschaft evaluiert. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann davon ausgegangen werden, dass phylogenetisch diverse fakultativ aerobe und obligat anaerobe potentielle Fermentierer im Niedermoor abundant und aktiv sind. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Fermentation und Methanogenese trophisch verknüpft sind und aktive Methanogene für Methanogenese im Niedermoor verantwortlich sind. Diese Ergebnisse dienen sowohl als Basis für die Weiterentwicklung des RNA Microarrays für *Archaea* als auch für die Entwicklung eines RNA Microarrays für *Bacteria*. Mit einem Microarray kann auf einfache Weise die komplette Diversität eines Standorts erfasst werden. Zugleich kann der Einfluss unterschiedlicher Faktoren im Freiland auf die mikrobielle Population bzw. räumliche und zeitliche Dynamiken untersucht werden. So können extremen Witterungsereignissen (Austrocknung und Wiederbefeuchtung) auf die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft untersucht werden, wie sie im Rahmen des Projekts „Dynamik von Bodenprozessen bei extremen meteorologischen Randbedingungen“ (FOR 562) simuliert wurden (2.1.).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Feuchtgebiete besitzen ca. 30% des globalen Kohlenstoffvorrats von Böden, sind charakterisiert durch dynamische O_2 -Gradienten und temporär vernachlässigbare Konzentrationen von anorganischen Elektronenakzeptoren, wie Sulfat und Nitrat. Sie sind eine der größten globalen CH_4 -Quellen. Bedeutende mikrobielle Prozesse sind Fermentation und Methanogenese. Daher war das Ziel dieser Arbeit (i) abundante fakultativ aerobe und/oder obligat anaerobe Fermentierer, (ii) Xylose- und Glucose-verwertende Fermentierer, (iii) Intermediate im Kohlenstofffluss zu CH_4 und (iv) aktive gemäßigt säuretolerante *Archaea* in einem nördlichen temperaten, sauren Niedermoor zu identifizieren.

Die Diversität und Struktur-Funktionsbeziehungen von *Bacteria* und *Archaea*, d. h. vor allem Fermentierern und Methanogenen, eines gemäßigt sauren Niedermoores wurden durch Anreicherung, Isolierung, 16S rRNA stable isotope probing (SIP) und 16S rRNA Genanalysen (Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese [DGGE], Terminale-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus [T-RFLP]-Analyse und Genbibliotheken) abgeschätzt. Säure-tolerante *Enterobacteriaceae*-, *Burkholderiaceae*- und *Pseudomonadaceae*-verwandte Arten wurden aus dem Niedermoor isoliert. Arten von *Neisseriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidetes*, *Pseudomonadaceae*, *Hydrogenophilaceae* und *Clostridia* wurden in Anreicherungskulturen aus seriellen Verdünnungen mit Moorboden identifiziert. In den Anreicherungskulturen wurden große Mengen an Fermentationsprodukten detektiert (z. B. Acetat, Butyrat und Formiat), was darauf hindeutet, dass Säure-tolerante, abundante fakultative Aerobier und obligate Anaerobier verantwortlich für Fermentation im Niedermoor sind. Es wurden fakultativ anaerobe potentiell neue Arten der Familien *Enterobacteriaceae* und *Burkholderiaceae* isoliert.

16S rRNA SIP identifizierte aktive Xylose- und Glucose-fermentierende *Bacteria* und aktive *Archaea*, inklusive Methanogene, in anoxischen Bodenaufschlammungen. Ethanol, Xylose und Glucose wurden zu Fettsäuren, CO_2 , H_2 und CH_4 unter gemäßigt sauren Bedingungen umgebaut, was darauf hindeutet, dass im Niedermoor gemäßigt säure-tolerante Ethanol-, Xylose- und Glucose-verwertende Fermentierer, sowie gemäßigt säure-tolerante Methanogene vorkommen. Da die Organismen der *Acidaminococcaceae*, *Pseudomonadaceae*,

Aeromonadaceae, *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae* und *Actinomycetales* aus Xylose- oder Glucose-gewonnenen Kohlenstoff verwerteten, tragen diverse fakultative Aerobier und obligate Anaerobier zum Kohlenstofffluss unter anoxischen Bedingungen im Niedermoor bei. Dass bislang unkultivierte *Euryarchaeota* (wie *Methanosarcinaceae*, *Methanobacteriaceae*) und *Crenarchaeota* durch 16S rRNA Analyse in anoxischen Bodenaufschlammungen identifiziert wurden, zeigte, dass im gemäßigt sauren Niedermoor neue Arten von Methanogenen und *Crenarchaeota* vorkommen, die zu anaeroben Wachstum fähig sind.

16S rRNA Gen Analysen zeigten, dass die Diversität der *Bacteria* größer war als die der *Archaea*. Im Vergleich von *Bacteria*- und *Archaea*- 16S rRNA Genbibliotheken 6 verschiedener Probenahmestandorte und 4 verschiedener Tiefenzonen (0-10, 10-20, 20-30, 30-40 cm) wurde keine signifikant unterschiedliche Diversität detektiert. Im Gegensatz dazu zeigten „fingerprinting“ Methoden (DGGE, T-RFLP) eine heterogene Verteilung der *Bacteria*- und *Archaea*- 16S rRNA Gene. Die Identifikation der 16S rRNA Gene zeigte eine phylogenetisch diverse Gemeinschaft innerhalb der *Bacteria* (z. B. *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacilli* und *Clostridia*) und *Archaea* (*Thermoplasmatales*, *Crenarchaeota* und *Methanobacteriales*).

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass säuretolerante, abundante und phylogenetisch diverse fakultativ Aerobe und obligat Anaerobe im Niedermoor räumlich heterogen sind, die wahrscheinlich am Kohlenstoffumsatz im Niedermoor beteiligt sind. Dabei treiben die aus Fermentation hervorgegangenen Moleküle hauptsächlich Methanogenese an, wenn keine anderen Elektronenakzeptoren als CO₂ vorkommen. Im Niedermoor kommen vor allem Xylose- und Glucose- verwertende fakultative Aerobe und obligate Anaerobe vor, die trophisch mit potentiell neuen gemäßigt säuretoleranten Methanogenen verknüpft sind.

6. SUMMARY

Wetlands harbor approximately 30% of the global reserves of soil carbon, are characterized by highly dynamic O_2 -gradients and temporarily negligible concentrations of inorganic electron acceptors, such as sulfate or nitrate, and are one of the most important global CH_4 sources. The main microbial processes are fermentation and methanogenesis. Thus, the objectives of this study were to identify (i) abundant facultative aerobic and/or obligate anaerobic fermenters (ii) xylose- and glucose-utilizing fermenters, (iii) intermediates in the carbon flow to methane, (iv) active moderately acid-tolerant *Archaea*, and (v) distribution of *Bacteria* and *Archaea* in a northern temperate moderately acidic fen.

The diversity and structure function relationships of *Bacteria* and *Archaea*, i.e. fermenters and methanogens, of an acidic fen were assessed by enrichment, isolation, 16S rRNA stable isotope probing (SIP) and 16S rRNA gene analyses (denaturing gradient gel electrophoresis [DGGE], terminal restriction fragment length polymorphism [T-RFLP], and clone libraries). Acid-tolerant *Enterobacteriaceae*-, *Burkholderiaceae*-, and *Pseudomonadaceae*-related species were isolated from the fen. Members of *Neisseriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidetes*, *Pseudomonadaceae*, *Hydrogenophilaceae*, and *Clostridia* were identified in enrichments from serial dilutions of fen soil producing high amount of fermentation products (i. e. acetate, butyrate, and formate), indicating that acid tolerant, abundant facultative aerobes and obligate anaerobes potentially facilitated fermentation in the fen. Facultative anaerobic potentially new species of the families *Enterobacteriaceae* and *Burkholderiaceae* were isolated.

16S rRNA-based stable isotope probing (16S rRNA-SIP) identified active xylose- and glucose-fermenting *Bacteria* and active *Archaea*, including methanogens, in anoxic slurries of material obtained from a moderately acidic, CH_4 -emitting fen. Ethanol, xylose, and glucose were converted to fatty acids, CO_2 , H_2 , and CH_4 under moderately acidic, anoxic conditions, indicating that the fen harbors moderately acid-tolerant ethanol-, xylose-, and glucose-using fermenters, as well as moderately acid-tolerant methanogens. Members of *Acidaminococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Aeromonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae*, and *Actinomycetales* utilized xylose- or glucose-derived carbon, suggesting that highly

diverse facultative aerobes and obligate anaerobes contribute to the flow of carbon in the fen under anoxic conditions. Uncultured *Euryarchaeota* (i.e., *Methanosarcinaceae*, *Methanobacteriaceae*) and *Crenarchaeota* were identified by 16S rRNA analysis in anoxic slurries, demonstrating that the acidic fen harbors novel methanogens and *Crenarchaeota* capable of anaerobiosis.

16S rRNA gene analyses revealed a higher diversity within the *Bacteria* than the *Archaea*, but within the domains similar species numbers were detected in comparison of 16S rRNA genes from 6 sampling sites and 4 depth layers (0-10, 10-20, 20-30, 30-40 cm) within the fen. Identification of bacterial and archaeal 16S rRNA genes revealed highly diverse communities in these sampling sites and depth layers. However, DGGE and T-RFLP analysis revealed a heterogeneous distribution of detected phylogenetic groups. Different members within the *Bacteria* (e.g., *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacilli*, and *Clostridia*), and *Archaea* (i.e. *Thermoplasmatales*, *Crenarchaeota*, and *Methanobacteriales*) were detected.

These collective approaches showed that acid-tolerant, abundant, and phylogenetically diverse facultative aerobes and obligate anaerobes are spatially heterogenic distributed, indicating that are likely involved in the turnover dynamics of carbon in this moderately acidic fen. Fermentation-derived molecules are conceived to be the primary drivers of methanogenesis when electron acceptors other than CO₂ are absent, and the collective findings of this study indicate that fen soils harbor diverse xylose- and glucose-utilizing facultative aerobes and obligate anaerobes that form trophic links to potentially novel moderately acid-tolerant methanogens.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed, Z., H. Banu, M. M. Rahman, F. Akhter, and M. S. Haque.** 2001. Microbial activity on the degradation of lignocellulosic polysaccharides. *Journal of Biological Science* **1**:993-997.
- Amann R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl.** 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:1919-1925.
- Amann R. I., J. Stromley, R. Devereux, R. Key, and D. A. Stahl.** 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:614-23.
- Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**:143-69.
- Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R. S. Wolfe.** 1979. Methanogens - re-evaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews* **43**:260-296.
- Becker, J. M., T. Parkin, C. H. Nakatsu, J. D. Wilbur, and A. Konopka.** 2006. Bacterial activity, community structure, and centimeter-scale spatial heterogeneity in contaminated soil. *Microbial Ecology* **51**:220-31.
- Belova, S. E., Pankratov, T. A., and S. N. Dedysh.** 2006. Bacteria of the genus *Burkholderia* as a typical component of the microbial community of *Sphagnum* peat bogs. *Microbiology* **75**:110-117.
- Blachnik, R.** (Hrsg.). 1998. D'Ans Lax Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Band 3. 4. Aufl. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Blaut, M.** 1994. Metabolism of methanogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**:187-208.
- Boone, D. R., W. B. Whitman, and P. Rouvière.** 1993. Diversity and taxonomy of methanogens, p. 35-80. *In* J. G. Ferry (ed.). *Methanogenesis*. Chapman & Hall, New York.
- Bräuer, S. L., H. Cadillo-Quiroz, E. Yashiro, J. B. Yavitt, and S. H. Zinder.** 2006. Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog. *Nature* **442**:192-194.

- Brenner D. J., G. M. Garrity, , N. R. Krieg, and J. T. Staley, G. M. Garrity, et al. (ed.).** 2005a. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed., vol. 2, the *Proteobacteria*, Part B, The *Gammaproteobacteria*. Springer. New York, NY.
- Brenner D. J., G. M. Garrity, , N. R. Krieg, and J. T. Staley, G. M. Garrity, et al. (ed.).** 2005b. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed., vol. 2, the *Proteobacteria*, Part C, The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*. Springer. New York, NY.
- Breure, A. M., K. A. Mooijman, and J. G. Vanandel.** 1986. Protein-degradation in anaerobic-digestion - Influence of volatile fatty-acids and carbohydrates on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. *Applied Microbiology and Biotechnology* **24**:426-431.
- Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter, and H. F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **148**:107-127.
- Buckel, W.** 2005. Special clostridial enzymes and fermentation pathways, p. 122-220. *In* P. Dürre (ed.), *Handbook on Clostridia*. CRC-Press, Boca Raton.
- Burggraf S., H. W. Jannasch, B. Nicolaus and K. O. Stetter.** 1990. *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **13**:24-28.
- Cadillo-Quiroz, H., S. Bräuer, E. Yashiro, C. Sun, J. Yavitt, and S. Zinder.** 2006. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. *Environmental Microbiology* **8**:1428-1440.
- Conrad, R.** 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews* **60**:609-640.
- Conrad, R.** 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **28**:193-202.
- Costa, R., N. C. M. Gomes, E. Krögerrecklenfort, K. Opelt, G. Berg, and K. Smalla.** 2007. *Pseudomonas* community structure and antagonistic potential in the rhizosphere: insights gained by combining phylogenetic and functional gene-based analyses. *Environmental Microbiology* **9**:2260-2273.
- Daniel, S. L., T. Hsu, S. I. Dean, and H. L. Drake.** 1990. Characterization of the H₂-dependent and CO-dependent chemolithotrophic potentials of the acetogens

- Clostridium thermoaceticum* and *Acetogenium kivui*. Journal of Bacteriology **172**:4464-4471.
- Daniel, S. L., and H. L. Drake.** 1993. Oxalate-dependent and glyoxylate-dependent growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. Applied and Environmental Microbiology **59**:3062-3069.
- Daniel, R.** 2005. The metagenomics of soil. Nature Reviews of Microbiology **3**:470-478.
- Dedysh, S. N., T. A. Pankratov, S. E. Belova, I. S. Kulichevskaya, and W. Liesack.** 2006. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of *Bacteria* community composition in an acidic *Sphagnum* peat bog. Applied and Environmental Microbiology **72**:2110-2117.
- Desvaux, M.** 2005. *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. FEMS Microbiology Reviews **29**:741-764.
- Drake, H. L., Küsel, K.** 2003. How the diverse physiological potentials of acetogens determine their *in situ* realities, p. 171-190. In L. G. Ljungdahl, M. W., Adams, L. L. Barton, J. G. Ferry, and M. K. Johnson (ed.). Biochemistry and physiology of anaerobic bacteria. Springer, New York.
- Drake, H. L., and K. Küsel.** 2005. Acetogenic *Clostridia*, p. 719-746. In P. Dürre (ed.), Handbook on *Clostridia*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Drake, H. L., K. Küsel, and C. Matthies.** 2006. Acetogenic prokaryotes, p. 354-420. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), The Prokaryotes. 3rd ed. Springer, New York.
- Drake, H. L., Gößner, A. S., and S. L. Daniel.** 2008. Old acetogens, new light, p. 100-128. In J. Wiegel, R. J. Maier, and M. W. W. Adams (ed.), Incredible Anaerobes: from Physiology to Genomics to Fuels. Special Issue (Vol. 1125) of Annals of the New York Academy of Sciences, Boston, MA.
- Dumont, M. G., and J. C. Murrell.** 2005. Stable isotope probing- linking microbial identity to function. Nature Reviews Microbiology **3**:499-504.
- Dürre, P.** 2005a. Formation of solvents in clostridia, p. 671-693. In P. Dürre (ed.), Handbook on *Clostridia*. CRC-Press, Boca Raton.
- Dürre P.** 2005b. Handbook on *Clostridia*. CRC-Press, Boca Raton.
- Egert, M., and M. W. Friedrich.** 2003. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length

- polymorphism analysis of microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2555-2562.
- Elomari, M., L. Coroler, B. Hoste, M. Gillis, D. Izard, and H. Leclerc.** 1996. DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 1138-1144.
- Eurola, S., S. Hicks, and E. Kaakinen.** 1984. Key to Finnish mire types. *In* P. D. Moore (ed.), *European Mires*. Academic Press, London.
- Felske, A., A. Wolterink, R. van Lis, W. M. de Vos, and A. D.L. Akkermans.** 1999. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiology Ecology* **30**: 137-145.
- Ferry, J. G., P. H. Smith, and R. S. Wolfe.** 1974. *Methanospirillum*, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of *Methanospirillum hungatei* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **24**: 465- 469.
- Ferry, J.G.** 1993. *Methanogenesis*. Chapman & Hall, New York.
- Flint, H. J.** 1997. The rumen microbial ecosystem--some recent developments. *Trends in Microbiology* **5**: 483-8.
- Galand, P. E., S. Saarnio, H. Fritze, and K. Yrjala.** 2002. Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen. *FEMS Microbiology Ecology* **42**:441-449.
- Galand, P. E., H. Fritze, and K. Yrjala.** 2003. Microsite-dependent changes in methanogenic populations in a boreal oligotrophic fen. *Environmental Microbiology* **5**:1133-43.
- Galand, P. E., H. Fritze, R. Conrad, and K. Yrjälä.** 2005. Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic *Archaea* in three boreal peatland ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:2195-2198.
- Garcia, J. L., B. K. Patel, and B. Ollivier.** 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. *Anaerobe* **6**:205-26.
- Garrity, G. M., and J. G. Holt.** 2001. The road map to the manual, p.119-166. *In* D. R. Boone, R. W. Castenholz, G. M. Garrity, et al. (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol.1, *The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria*. Springer, New York.

- Gerstberger, P.** 2001a. Naturräumliche und geomorphologische Übersicht über das Fichtelgebirge, p. 1-4. *In* P. Gerstberger (ed.). Bayreuther Forum Ökologie, 90, Waldökosystemforschung in Nordbayern: Die BITÖK-Untersuchungsflächen im Fichtelgebirge und Steigerwald.
- Gerstberger, P.** 2001b. Zur Vegetation des Fichtelgebirges, p. 5-10. *In* P. Gerstberger (ed.). Bayreuther Forum Ökologie, 90, Waldökosystemforschung in Nordbayern: Die BITÖK-Untersuchungsflächen im Fichtelgebirge und Steigerwald.
- Gorham, E.** 1991. Northern Peatlands - Role in the Carbon-Cycle and Probable Responses to Climatic Warming. *Ecological Applications* **1**:182-195.
- Gottschalk, G.** 1986. Bacterial metabolism, 2nd ed. Springer, New York.
- Griffiths, R. I., A. S. Whiteley, A. G. O'Donnell, and M. J. Bailey.** 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:5488-5491.
- Gsell, T. C., Holben, W. E., and R. M. Ventullo.** 1997. Characterization of the sediment bacterial community in groundwater discharge zones of an alkaline fen: a seasonal study. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:3111-3118.
- Gutknecht, J. L. M., R. M. Goodman, and T. C. Balser.** 2006. Linking soil process and microbial ecology in freshwater wetland ecosystems. *Plant Soil* **289**:17-34.
- Halda-Alija, L.** 2003. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effuses* L. *Canadian Journal of Microbiology* **49**(12):781-787.
- Hansel, C. M., S. Fendorf, P. M. Jardine, and C. A. Francis.** 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 1620-1633.
- Hedderich, R., and W. B. Whitman.** 2006. Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea, p. 1050-1079. *In* S. Falkow, E. Rosenberg, and M. Dworkin (ed.). *The Prokaryotes, Volume 2, Ecophysiology and Biochemistry: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York.

- Høj, L., R. A. Olsen, and V. L. Torsvik.** 2005. Archaeal communities in high arctic wetlands at Spitsbergen, Norway (78 degrees N) as characterized by 16S rRNA gene fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology* **53**:89-101.
- Holdeman, L. V., E. P. Cato, and W. E. C. Moore.** 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*, p. 1-156, 4th ed. Blacksburg. Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Hoondal, G. S., R. P. Tiwari, R. Tewari, N. Dahiya, and Q. K. Beg.** 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**:409-418.
- Horn, M. A., C. Matthies, K. Kusel, A. Schramm, and H. L. Drake.** 2003. Hydrogenotrophic methanogenesis by moderately acid-tolerant methanogens of a methane-emitting acidic peat. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:74-83.
- Hornibrook, E. R. C., F. J. Longstaffe, and W. S. Fyfe.** 1997. Spatial distribution of microbial methane production pathways in temperate zone wetland soils: stable carbon and hydrogen isotope evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61**:745-753.
- Hungate, R. E.** 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, p. 117-132. *In* J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.). *Methods in Microbiology*. Academic Press, New York.
- Hunter, P. J., G. M. Petch, L. A. Calvo-Bado, T. R. Pettitt, N. R. Parsons, J. A. W. Morgan, and J. M. Whipps.** 2006. Differences in microbial activity and microbial populations of peat associated with suppression of damping-off disease caused by *Pythium sylvaticum*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:6452-6460.
- Hurlbert, S. H.** 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* **52**:577-586.
- Imhoff, J. F.** 2001. Transfer of *Rhodopseudomonas acidophila* to the new genus *Rhodoblastus* as *Rhodoblastus acidophilus* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**:1863-1866.
- Itoh, T.** 2003. Taxonomy of nonmethanogenic hyperthermophilic and related thermophilic *Archaea*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**:203-212.

- Jaatinen, K., R. Laiho, A. Vuorenmaa, U. del Castillo, K. Minkkinen, T. Pennanen, T. Penttilä, and H. Fritze.** 2007. Responses of aerobic microbial communities and soil respiration to water-level drawdown in a northern boreal fen. *Environmental Microbiology* 10:339-353.
- Janssen, P. H., P. S. Yates, B. E. Grinton, P. M. Taylor, and M. Sait.** 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology* 86:2391-2396.
- Juottonen, H., P. E. Galand, E.-S. Tuittila, J. Laine, H. Fritze, and K. Yrjälä.** 2005. Methanogen communities and *Bacteria* along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. *Environmental Microbiology* 7:1547-1557.
- Jurgens G., Glöckner F., Amann R., Saano A., Montonen L., Likolammi M. and U. Munster.** 2000. Identification of novel *Archaea* in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent *in situ* hybridization. *FEMS Microbiology Ecology* 34:45-56.
- Kane, M. D., and J. Breznak.** 1991. *Acetonema longum* gen. nov. sp. nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the termite, *Pterotermes occidentis*. *Archives of Microbiology* 156:91-98.
- Kemnitz, D., S. Kolb, and R. Conrad.** 2007. High Abundance of *Crenarchaeota* in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiology Ecology* 60:442-448.
- Kishimoto, N., Y. Kosako, and T. Tano.** 1991. *Acidobacterium capsulatum* gen., nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinon from acidic mineral environment. *Current Microbiology* 22:1-7.
- Könneke, M., A. E. Bernhard, J. de la Torre, C. B. Walker, J. B. Waterbury, and D. A. Stahl.** 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543-546.
- Kotelnikova, S. V., A. Y. Obratsova, G. M. Gongadze, and K. S. Laurinavichius.** 1993. *Methanobacterium thermoflexum* sp. nov. and *Methanobacterium defluvii* sp. nov., thermophilic rodshaped methanogens isolated from anaerobic digester sludge. *Systematic and Applied Microbiology* 16:427-435.
- Kotsyurbenko, O. R., K. J. Chin, M. V. Glagolev, S. Stubner, M. V. Simankova, A. N. Nozhevnikova, and R. Conrad.** 2004. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. *Environmental Microbiology* 6:1159-1173.

- Kotsyurbenko, O. R.** 2005. Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology* **53**:3-13.
- Kotsyurbenko, O. R., M. W. Friedrich, M. V. Simankova, A. N. Nozhevnikova, P. N. Golyshin, K. N. Timmis, and R. Conrad.** 2007. Shift from acetoclastic to H₂-dependent methanogenesis in a West Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic *Methanobacterium* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:2344-2348.
- Kraigher, B., B. Stres, J. Hacin, L. Ausec, I. Mahne, J. D. van Elsas, and I. Mandic-Mulec.** 2006. Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh. *Soil Biology and Biochemistry* **38**:2762-2771.
- Kuhner, C. H., H. L. Drake, E. Alm, and L. Raskin.** 1996. Methane production and oxidation by soils from acidic forest wetlands of east-central Germany. Abstract of the General Meeting of the American Society of Microbiology **96**:304.
- Kuhner, C. H., C. Matthies, G. Acker, M. Schmittroth, A. Gößner, and H. L. Drake.** 2000. *Clostridium akagii* sp. nov. and *Clostridium acidisoli* sp. nov.: acid-tolerant, N₂-fixing Clostridia isolated from acidic forest soil and litter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**:873-881.
- Kurr M., R. Huber, H. König, H. W. Jannasch, H. Fricke, A. Trincone, J. K. Kristjansson, and K. O. Stetter.** 1991. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Archives of Microbiology* **156**:239-247.
- Küsel, K., and H. L. Drake.** 1995. Effects of environmental parameters on the formation and turnover of acetate by forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:3667-3675.
- Küsel, K., C. Wagner, and H. L. Drake.** 1999. Enumeration and metabolic product profiles of the anaerobic microflora in the mineral soil and litter of a beech forest. *FEMS Microbiology Ecology* **29**:91-103.
- Küsel K., T. Dorsch, G. Acker, E. Stackebrandt, and H. L. Drake.** 2000. *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium

- from acidic sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**:537-546.
- Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England.
- Lawford, H. G., and J. D. Rousseau.** 1993. Mannose fermentation by an ethanologenic recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* **15**:615-620.
- Liesack, W., P. H. Janssen, F. A. Rainey, N.-L. Ward-Rainey, and E. Stackebrandt.** 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques, p. 375-439. *In* J. D. Van Elsas, J. T. Trevors, and E. M. H. Wellington (ed.). *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York.
- Lischeid, G., K. Moritz, and J. Bittersohl.** 2001. Hydrologie im Einzugsgebiet Lehstenbach, p. 91-101. *In* P. Gerstberger (ed.), *Bayreuther Forum Ökologie*, vol. 90. *Waldökosystemforschung in Nordbayern: Die BITÖK-Untersuchungsflächen im Fichtelgebirge und Steigerwald*.
- Liu, W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng, and L. J. Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:4516-4522.
- Lottspeich, F., and J. W. Engels.** 2006. *Bioanalytik*. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Deutschland.
- Loy A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K.-H. Schleifer, and M. Wagner.** 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:5064-5081.
- Loy A., F. Maixner, M. Wagner, M. Horn.** 2007. probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Research* **35**:D800-D804.
- Lüders, T., M. Manefield, and M. W. Friedrich.** 2004. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology* **6**:73-78.

- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Y. Kumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Förster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüßmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K.-H. Schleifer.** 2004. ARB: a software environment for sequence data, *Nucleic Acids Research* **32**:1363-1371.
- Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, and K.-H. Schleifer.** 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**:554-568.
- Lüttge, U., M. Kluge, and G. Bauer.** 1999. Botanik, 3rd ed. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Lyimo, T. J., A. Pol, H. J. M. Op den Camp, H. R. Harhangi , and G. D. Vogels.** 2000. *Methanosarcina semesiae* sp. nov., a dimethylsulfide-utilizing methanogen from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**:171–178.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker.** 2006. Brock - Biology of Microorganisms, 11th ed. Prentice-Hall International, Upper Saddle River, New Jersey.
- Maltby, E., and P. Immirzi.** 1993. Carbon dynamics in peatlands and other wetland soils, regional and global perspectives. *Chemosphere* **27**:999-1023.
- Manefield, M., A. S. Whiteley, R. I. Griffiths, and M. J. Bailey.** 2002. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to Phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:5367-5373.
- Massol-Deya, A. A., D. A. Odelson, R. F. Hickey, and J. M. Tiedje.** 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). *Molecular Microbial Ecology Manual* **3.3.2**:1-8.
- Matthies, C., A. Freiburger, and H. L. Drake.** 1993. Fumarate dissimilation and differential reductant flow by *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium aceticum*. *Archives of Microbiology* **160**:273-278.
- Matzner, E., and B. Huwe.** 2004. Antrag zur Einrichtung einer Forschergruppe der DFG zum Thema "Dynamik von Bodenprozessen bei extremen

- meteorologischen Randbedingungen", Teilprojekt "Zentrale Experimente". Universität Bayreuth, Bayreuth.
- McInerney, M. J., and M. P. Bryant.** 1980. Syntrophic associations of hydrogen utilizing methanogenic bacteria and hydrogen producing alcohol and fatty acid degrading bacteria in anaerobic degradation of organic matter, p.117-126. *In* G. Gottschalk, N. Pfennig, and H. Werner (ed.). Anaerobes and anaerobic infections. Gustav Fischer Verlag, Munich, Germany.
- McInerney, M. J., and M. P. Bryant.** 1981. Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis, p. 277-296. *In* S. S. Sofer and O. R. Zaborsky (ed.). Biomass conversion processes for energy and fuels. Plenum, New York.
- McInerney, M. J., C. G. Struchtemeyer, J. Sieber, H. Mouttaki, A. J. M. Stams, B. Schink, L. Rohlin, and R. P. Gunsalus.** 2008. Physiology, Ecology, Phylogeny, and Genomics of Microorganisms capable of Syntrophic Metabolism, p.58-72. *In* J. Wiegel, R. J. Maier, and M. W. W. Adams (ed.). Incredible Anaerobes from Physiology to Genomics to Fuels. Annuals of the New York Academy of Science (Vol. 1125), New York.
- Meselson, M., and F. W. Stahl.** 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **44**:671-682.
- Messing, J.** 1983. New M13 Vectors for Cloning. Methods in Enzymology **101**:20-78.
- Mitchell, W. J.** 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by *Clostridia*. Advances in Microbial Physiology **39**:31-130.
- Moore, P. D.** 1990. Soils and ecology: temperate wetlands, p. 95-114. *In* M. Williams (ed.). Wetlands: a threatened landscape. Blackwell Publishers, Oxford.
- Moore, T. R., N. T. Roulet, and J. M. Waddington.** 1998. Uncertainty in predicting the effect of climatic change on the carbon cycling of Canadian peatlands. Climatic Change **40**:229-245.
- Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. M. Santegoeds, H. Schäfer, and C. Wawer.** 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology, p. 1-27. *In* A. D. L. Akkermans, J. D. Van Elsas, and F. J. de Bruin (ed.), Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Nicol, G.W., and C. Schleper.** 2006. Ammonia-oxidising *Crenarchaeota*: important players in the nitrogen cycle? Trends in Microbiology **14**:207-212.
- Nigam, P., and D. Singh.** 1995. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing. Enzyme and Microbial Technology **17**:770-778.
- Nilsson, M., and E. Bohlin.** 1993. Methane and carbon-dioxide concentrations in bogs and fens - with special reference to the effects of the botanical composition of the peat. Journal of Ecology **81**:615-625.
- Opelt, K., Chobot, V., Hadacek, F., Schönmann, S., Eberl, L., and G. Berg.** 2007. Investigations of the structure and function of bacterial communities associated with *Sphagnum* mosses. Environmental Microbiology **9**:2795-2809.
- Opelt, K., Chobot, V., Hadacek, F., Schönmann, S., Eberl, L., and G. Berg.** 2007. Investigations of the structure and function of bacterial communities associated with *Sphagnum* mosses. Environmental Microbiology **9**:2795-2809.
- Pacchauri, R. K., and A. Reisinger (ed.).** 2007. Climate change 2007: synthesis report. Contribution of Working groups I, II and III to the fourth assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Intergovernmental Panel on Climate Change, Geneva, Switzerland.
- Pankratov, T. A., Y. M. Serkebaeva, I. S. Kulichevskaya, W. Liesack, and S. Dedysh.** 2008. Substrate-induced growth and isolation of *Acidobacteria* from acidic *Sphagnum* peat. The ISME Journal:1-10.
- Patel, G. B.** 1984. Characterization and nutritional properties of *Methanothrix concilii* sp. nov., a mesophilic, acetoclastic methanogen. Canadian Journal of Microbiology **30**:1383-1396.
- Paul, S.** 2003. Heterogenität der Sulfatreduktion im Einzugsgebiet des Lehstenbachs, Fichtelgebirge. Diplomarbeit. Universität Bayreuth, Deutschland.
- Paul, S., K. Küsel, and C. Alewell.** 2006. Reduction processes in forest wetlands: Tracking down heterogeneity of source/sink functions with a combination of methods. Soil Biology and Biochemistry **38**:1028-1039.
- Raskin L., J. M. Stromley, B. R. Rittmann, and D. A. Stahl.** 1994. Group-specific 16SrRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. Applied and Environmental Microbiology **60**:1232-1240.

- Reiche, M., G. Neumann, and K. Küsel.** 2008. Competition of Fe(III)-reduction and methanogenesis in a slightly acidic fen. *FEMS Microbiology Ecology*. (in press).
- Ricke, P., S. Kolb, and G. Braker.** 2005. Application of a newly developed ARB software integrated tool for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis reveals the dominance of a novel *pmoA* cluster in a forest soil. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:1671-1673.
- Rodhe, H.** 1990. A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse-effect. *Science* **248**:1217-1219.
- Saarnio, S., T. Saarinen, H. Vasander, and J. Silvola.** 2000. A moderate increase in the annual CH₄ efflux by raised CO₂ or NH₄NO₃ supply in a boreal oligotrophic mire. *Global Change Biology* **6**:137-144.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Sait, M., P. Hugenholtz, and P. H. Janssen.** 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology* **4**:654-66.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schink, B.** 1994. Diversity, ecology, and isolation of acetogenic bacteria, p. 197-235. *In* H. L. Drake (ed.), *Acetogenesis*. Chapman & Hall, New York.
- Schink, B.** 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**:262-80.
- Schlegel, H. G.** 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schmalenberger, A., H. L. Drake, and K. Küsel.** 2007. High unique diversity of sulfate-reducing prokaryotes characterized in a depth gradient in an acidic fen. *Environmental Microbiology* **9**:1317-1328.
- Schwarz, W. H.** 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**:634-649.
- Segers, R.** 1998. Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry* **41**:23-51.

- Shchepinov, M. S., S. C. Case-Green, and E. M. Southern.** 1997. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research* **25**:1155-1161.
- Sizova, M. V., N. S. Panikov, E. M. Spiridonova, N. V. Slobodova, T. P. Tourova.** 2007. Novel facultative anaerobic acidotolerant *Telmatospirillum siberiense* gen. nov. sp. nov. isolated from mesotrophic fen. *Systematic and Applied Microbiology* **30**:213-220.
- Skinner, F. A.** 1975. Anaerobic bacteria and their activities in soil, p. 1-19. *In* N. Walker (ed.), *Soil Microbiology*. Butterworth, London.
- Southern, E., K. Mir, and M. Shchepinov.** 1999. Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics* **21**:5-9.
- Stackebrandt, E. and J. Ebers.** 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today*, nov 06:6-9.
- Stahl, D. A. and R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205-248. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Stephen, K. D., J. R. M. Arah, W. Daulat, and R. S. Clymo.** 1998. Root-mediated gas transport in peat determined by argon diffusion. *Soil Biology and Biochemistry* **30**:501-508.
- Stetter, K. O., M. Thomm, J. Winter, G. Wildgruber, H. Huber, W. Zillig, D. Jane-Covic, H. König, P. Palm, and S. Wunderl.** 1981. *Methanothermus fervidus* sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an Icelandic hot spring. *Zentralbl Mikrobiol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig* **C2**:166-178.
- Stewart, C. S., S. H. Duncan, A. J. Richardson, A. G. Calder, and P. J. S. Dewey.** 1995. The effect of the presence of glucose on the fermentation of mannose by the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* strain RE1. *FEMS Microbiology Letters* **127**:57-63.
- Stoop, J. M. H., J. D. Williamson, and D. M. Pharr.** 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science* **1**:139-144.
- Tabatabai, M. A.** 1992. Appendix: Methods of measurements of sulphur in soils, plants, materials and water, p. 307-344. *In* R. W. Howarth, J. W. B. Stewart, and M. V. Ivanov (ed.), *Sulphur Cycling on the Continents: Wetlands,*

- Terrestrial Ecosystems and Associated Water Bodies (Scope 48). John Wiley & Sons, West Sussex.
- Tamura, H., K. Goto, Yotsuyan.T, and M. Nagayama.** 1974. Spectrophotometric Determination of Iron(II) with 1,10-Phenanthroline in Presence of Large Amounts of Iron(III). *Talanta* **21**:314-318.
- Thauer, R. K., K. Jungermann, H. Henninger, J. Wenning, and K. Decker.** 1968, The energy metabolism of *Clostridium klyveri*. *European Journal of Biochemistry* **4**:173-180.
- Thauer, R. K., R. Hedderich, and R. Fischer.** 1993. Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂, p. 209-252. *In* J. G. Ferry (ed.). *Methanogenesis*. Chapman & Hall, New York.
- Trckova, M., L. Matlova, H. Hudcova, M. Faldyna, Z. Zraly, L. Dvorska, V. Beran, and I. Pavlik.** 2005. Peat as a feed supplement for animals: a review. *Veterinari Medicina* **50**:361-377.
- Tyler, S. C.** 1991. The global methane budget, p. 7-38. *In* J. E. Rogers and W. B. Whitman (ed.). *Microbial production and consumption of greenhouse gases: methane, nitrogen oxides and halomethanes*. American Society for Microbiology, Washington.
- van Veen, J. A., R. Merckx, and S. C. van de Geijn.** 1989. Plant and soil related controls of the flow of carbon from roots through the soil microbial biomass. *Plant and Soil* **115**:179-188.
- Velghe, N., and A. Claeys.** 1985. Rapid spectrophotometric determination of nitrate in mineral waters with resorcinol. *Analyst* **110**:313-314.
- Wahlen, M.** 1993. The global methane cycle. *Annual Reviews of Earth and Planetary Science* **21**:407-426.
- Wallner G., R. Amann, and W. Beisker.** 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*. **14**:136-143.
- Wang, Z., D. Zeng, and W. H. Patrick Jr.** 1996. Methane emissions from natural wetlands. *Environmental Monitoring and Assessment* **42**:143-161.
- Westermann, P.** 1993. Wetland and swamp microbiology, p. 215-238. *In* T. E. Ford (ed.), *Aquatic Microbiology, an Ecological Approach*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Wildgruber, G., M. Thomm, H. König, K. Ober, T. Ricchiuto, and K. O. Stetter.** 1982. *Methanoplanus limicola*, a plate-shaped methanogen representing a novel family, the *Methanoplanaceae*. Archives of Microbiology **132**:31-36.
- Williams, R. T., and R. L. Crawford.** 1983. Effects of various physiochemical factors on microbial activity in peatlands - Aerobic Biodegradative Processes. Canadian Journal of Microbiology **29**:1430-1437.
- Woese, C. R., O. Kandler, and M. L. Wheelis.** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. Prokaryotic National Academy of Science USA **87**:4576-4579.
- Wüst, P.** 2006. Struktur-Funktionsbeziehungen der säure-toleranten, anaeroben Prokaryoten eines Niedermoores. Diplomarbeit am Lehrstuhl Ökologische Mikrobiologie. Universität Bayreuth.
- Wüst, P., M. A. Horn, and H. L. Drake.** 2008. Formate-dependent methanogenesis and archaeal populations in a moderately acidic temperate fen. Environmental Microbiology (in preparation).
- Zehnder, A. J. B., and W. Stumm.** 1988. Geochemistry and biochemistry of anaerobic habitats, p. 1-38. In A. J. B. Zehnder (ed.). Biology of Anaerobic Microorganisms. John Wiley & Sons, New York.
- Zeikus, J. G.** 1981. Lignin metabolism and the carbon-cycle - polymer biosynthesis, biodegradation, and environmental recalcitrance. Advances in Microbial Ecology **5**:211-243.
- Zinder, S. H.** 1993. Physiological ecology of methanogens, p. 128-206. In J. G. Ferry (ed.). Methanogenesis. Chapman & Hall, New York.

8. DANKSAGUNG

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Harold L. Drake für die Überlassung des interessanten Themas, die zahlreichen Anregungen und für die Möglichkeit der Erlernung neuer Methoden in Warwick und Wien. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Marcus Horn für dessen Betreuung und der zahlreichen fachlichen Diskussionen, Ratschläge und Hilfestellungen.

Ich möchte mich herzlich bei Kathrin Göschel für das Ansetzen des umfangreichen Kultivierungsversuchs und ihre Hilfestellung dabei bedanken. Weiterhin bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Ökologische Mikrobiologie für die angenehme und freundliche Atmosphäre und stete Hilfsbereitschaft. Besonders herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Pia Wüst für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen, den Aufmunterungen und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Prof. Dr. Gebauer und den Mitgliedern des Lehrstuhls für Bodenkunde danke ich für die häufige Bereitstellung des Wurzelbohrers. Außerdem sei Dr. G. Lischeid für die Betreuung der Versuchsfächen gedankt.

Prof. J. Colin Murrell und Dr. Marc G. Dumont möchte ich sehr für die Erlernung der SIP Methode danken und für den angenehmen und lehrreichen Aufenthalt an der University of Warwick.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. M. Wagner, Dr. A. Loy und Doris Steger der Universität Wien für die Einführung in die Microarray Analyse und die hilfreichen Ratschläge bei der Entwicklung meines Microarrays.

Besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. G. Rambold und Dr. A. Weig für die Nutzung des DNA Analytik Labors und die Hilfestellung bedanken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. M. Thomm und Dr. H. Huber des Archaeenzentrums der Universität Regensburg für die Bereitstellung von genomischer DNA und gefriergetrockneter Zellen thermophiler Archaeen.

Besonders herzlich danke ich Randy Reinheimer für den guten Zuspruch, die vielen Aufmunterungen und die Unterstützung. Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen für die jahrelange Unterstützung danken.

9. PUBLIKATIONEN

Poster

Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgenden Tagungen veröffentlicht:

- Hamberger A., H. L. Drake, and M. A. Horn.** 2008. Anaerobic Consumers of Monosaccharides in a Moderately Acidic Fen as Revealed by rRNA-Stable Isotope Probing. Abstractband zum BayCEER-Workshop 2008, Abstract P17.
- Hamberger A., H. L. Drake, and M. A. Horn.** 2008. Anaerobic Consumers of Monosaccharides in a Moderately Acidic Fen as Revealed by rRNA-Stable Isotope Probing. Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung 2008, Biospektrum Sonderausgabe 2008, S. 93, Abstract PA37.
- Hamberger A., H. L. Drake, and M. A. Horn.** 2007. Functional Diversity of Fermenters and Methanogens in a Temperate Acidic Fen. Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung 2007, Biospektrum Sonderausgabe 2007, S. 127, Abstract PF054.
- Hamberger A., H. L. Drake, and M. A. Horn.** 2007. Structure and Function of Fermenters and Methanogens in an Acidic Fen, Tagungsband des internationalen Symposiums: Soil processes under extreme meteorological conditions 2007, Universität Bayreuth, S. 54.

Weitere Poster:

- Hamberger A., H. L. Drake, and M. A. Horn.** 2005. N₂O-producing Microbiota of Mongolian Forest and Arid Steppe Permafrost Soils: Different Denitrification Activities, Similar *nosZ* Communities. Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung 2005, Biospektrum Sonderausgabe 2005, S.92, Abstract MÖP006.

Vorträge

- Hamberger A., H. L. Drake, and M. A. Horn.** 2007. Structure and Function of Fermenters and Methanogens in an Acidic Fen, Tagungsband des internationalen Symposiums: Soil processes under extreme meteorological conditions 2007, Universität Bayreuth, S. 54 (Kurzvortrag des Posters).

Hamberger A. Oktober 2006. Structure and Function of Fermenters and Methanogens in an Acidic Fen. Seminar am Lehrstuhl Mikrobielle Ökologie der Universität Wien.

Hamberger A. Oktober 2005. Structure and Function of Fermenters and Methanogens in Peatlands. Seminar am Department of Biological Sciences der University of Warwick, UK.

Artikel in Zeitschriften mit „Peer-Review“-System

Hamberger A., M. A. Horn, M. G. Dumont, J. C. Murrell, and H. L. Drake. 2008. Anaerobic Consumers of Monosaccharides in a Moderately Acidic Fen. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:3112-3120.

Weitere Artikel in Bearbeitung:

Hamberger A., M. A. Horn, and H. L. Drake, 2008. Prokaryotic Heterogeneity and Structure-Function Relationships in a Moderately Acidic Fen. *Environmental Microbiology* (in preparation).

Hamberger A., M. A. Horn, and H. L. Drake. 2008. N₂O-producing Microbiota of Mongolian Taiga Forest and Arid Mountain Steppe Permafrost Soils: Different Denitrification Activities, Similar *nosZ* Communities. *Environmental Microbiology* (in preparation).

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Weiterhin versichere ich, dass ich bei keiner anderen Universität einen Promotionsgesuch eingereicht, noch eine Dissertation begonnen habe.

Alexandra Hamberger